

Untersuchungen zur Domäneninteraktion von *hPin1* mit NMR

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

des Fachbereichs
Biologie und Geografie
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Christian Sinnen

aus Köln
am 01. Dezember 2008

*"Nicht in der Erkenntnis liegt das Glück,
sondern im Erwerben der Erkenntnis"*

Edgar Allan Poe (1809-1849)

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Zentrum für Medizinische Biotechnologie der Universität Duisburg-Essen sowie dem Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Bayer
2. Gutachter: Prof. Dr. Hoffmann

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Sandmann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.02.2009

* Ist nicht vom/n Doktoranden/in auszufüllen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Symbolverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Aminosäuren und Proteine	1
1.2 Der Zellzyklus	4
1.3 Die Parvuline	5
1.4 Struktur und Funktion von Pin1	8
1.5 Stand der Forschung	11
1.6 Zielsetzung der Arbeit	14
2 Material und Methoden	15
2.1 NMR	15
2.1.1 Grundlagen der NMR	15
2.1.2 Chemische Verschiebung, Austausch und Koaleszenz	20
2.1.3 ¹⁵ N-HSQC's	22
2.1.4 Relaxationsmessungen	23
2.1.5 Kern-Overhauser Effect (NOE)	24
2.2 Datenauswertung und verwendete Software	25
2.3 Verwendete Pin1-Konstrukte	26
2.3.1 Überblick über die Konstrukte	26
2.4 Proteinexpression und Reinigung	28
2.4.1 Verwendete Medien und Puffer	28
2.4.2 Anzucht	29
2.4.3 Aufschluss und Reinigung	30
2.4.4 Probenvorbereitung	30
2.5 Titration im NMR-Röhrchen	31
3 Ergebnisse	32
3.1 Einfluss der Temperatur auf die Struktur von Pin1	32
3.1.1 Ergebnisse der Temperaturmessung von Pin1	32
3.1.2 Einfluss der Temperatur auf Pin1-Konstrukte	37
3.2 Messung mit Polyethylenglykol	39
3.2.1 Ergebnisse der Messung mit Peg400	41
3.2.2 Einfluss von Peg auf die Pin-Konstrukte	51
3.3 Messung mit dem Peptid Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA	52
3.3.1 Ergebnisse der Peptidmessung	53

3.4	Relaxationsmessungen	61
3.4.1	Ergebnisse der Relaxationsmessungen	62
4	Diskussion	69
4.1	Ursache der Signalaufspaltungen in den ^{15}N -HSQC-Spektren	69
4.2	Weist eine Kolaszenz auf zwei Zustände hin?	70
4.3	Wie stark ist die Wechselwirkung zwischen den Domänen?	71
4.4	Einfluss von Liganden auf die Konformation	72
4.4.1	Peg-Einfluss auf die Relaxationszeiten	73
4.4.2	Über die Aufspaltungen lässt sich der Einfluss des schwachen Binders Peg auf die Domäneninteraktion beschreiben	76
4.4.3	Wie stark bindet Peg an Pin1?	77
4.5	Wie flexibel ist die Struktur der WW-Domäne	78
4.6	Wie bildet sich zeitlich das Interface aus?	81
4.7	Funktion der Konformationen	84
4.8	Neue Screening-Methode	84
5	Ausblick	86
5.1	Neue Ansätze zur Untersuchung der Domäneninteraktion	86
6	Zusammenfassung	88
	Literaturverzeichnis	90
	Anhang	94
	Danksagung	110
	Lebenslauf	113
	Erklärungen	114

Abkürzungsverzeichnis

^{15}N -HSQC	^{15}N - ^1H -HSQC, Hetero Single Quantum Coherence
2D	zweidimensional
<i>short</i> Pin1	Pin1 mit einem um 4 Aminosäuren gekürzten Linker Pin1
c	Konzentration
Cdk	Cyclin-abhängige Proteinkinase
FID	Free Induction decay
FKBP	FK506 Binding Proteins
ft	Fourier Transformation
G ₁ /G ₂ -Phase	Gap-Phase der Mitose
Het-NOE	Heteronuclear Overhauser Effect
K _D	Dissoziationskonstante
m	Masse
M _w	Molekulargewicht
M-Phase	Mitose
mM	Millimolar
ms	Millisekunde
NIMA	Never In Mitosis gene A
NMR	Kernspinresonanz
ns	Anzahl der Scans
Peg-BS	Peg-Bindungsseite
Peg400	Polyethylenglykol mit einem Molekulargewicht von 400 Da
Pin1	Protein Never in Mitosis Gene A Interacting-1
Pin1 _{fl}	full length Pin1
Pin1 _{WW}	WW-Domäne von Pin1
pNA	para-Nitroanilin
PPIase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis-trans</i> -Isomerase
ppm	parts per million
PROXYL	3-(2-Iodoacetamido)-PROXYL

r	Radius
rg	Verstärkungsfaktor
rpm	Umdrehungen pro Minute
RSA	Röntgenstrukturanalyse
s	Sekunde
S/N	Signal-Rausch-Verhältnis
SDS	Natriumdodecylsulfat
Stabw	Standardabweichung
sw	Spektrale Breite

Symbolverzeichnis

ΔG°	Freie Enthalpie (Gibb'sche Energie)
ΔT	Temperaturdifferenz
γ	gyromagnetisches Verhältnis
ω	Winkelgeschwindigkeit
τ	Zeit zwischen zwei Pulsen
τ_c	Rotations-Korrelationszeit
θ	Rotationswinkel eines Kernels im Magnetfeld
\emptyset	Mittelwert
T1	Zeitkonstante der Spin-Gitter-Relaxation
T1/T2	Relaxationszeiten für T1 und T2
T2	Zeitkonstante der Spin-Spin-Relaxation
T2*	Zeitkonstante der T2-Relaxation, die alle Einflüsse beschreibt, die zur Abnahme der Phasenkohärenz beitragen

Abbildungsverzeichnis

1.1	Peptidbindung	1
1.2	Aminosäurestrukturen	3
1.3	Der Zellzyklus und dessen Regulation	4
1.4	<i>cis/trans</i> -Isomerisierung	6
1.5	Sequenz-Vergleich der Pin1-Typen	7
1.6	Struktur von Pin1	8
1.7	Strukturelemente von Pin1	9
1.8	Struktur von Pin1	10
1.9	Substrate von Pin1	13
2.1	Besetzung der Energielevel in einem äußeren Magnetfeld	16
2.2	Ausrichtung halbzahliger Spins im Magnetfeld	16
2.3	Besetzung der Energielevel nach einem Puls	18
2.4	Magnetisierung	19
2.5	Aufspaltung von Signalen	21
2.6	Prinzip der T1/T2-Relaxation	24
2.8	Konstrukt Pin1 _{<i>fl</i>}	26
2.9	Konstrukt Pin1 _{<i>ww</i>}	27
2.10	Konstrukt <i>shortPin1</i>	27
3.1	Temperaturreihe – Überlagerung der Spektren	33
3.2	Temperaturreihe – Übersicht aufspaltender Signale	34
3.3	Temperaturreihe – Distanz zwischen A+B	35
3.4	Temperaturreihe – Populationen von A+B	36
3.5	Temperaturreihe – Vergleichsmessungen: Überlagerung der Spektren	38
3.6	Peg-Reihe – Übersicht Verschiebungen	41
3.7	K _D -Werte: Peg	43
3.8	Peg-Reihe – Übersicht aufspaltender Signale	45
3.9	Peg-Reihe – Kristallstruktur 1PIN mit Peg	46
3.10	Pegmessung – Populationsumkehr A31 und T29	47
3.11	Peg-Reihe – Populationsumkehr A31 und S32	48
3.12	Peg-Reihe – Schnittpunkte der Populationsumkehr	49
3.13	Peg-Reihe – Lage der AS der Populationsumkehr in der Struktur	50
3.14	Peg-Reihe – Freie Enthalpie zwischen den Zuständen	51
3.15	Peg-Reihe – Signale der Vergleichsmessreihen	52
3.16	Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA– <i>cis/trans</i> -Konformation	53
3.17	Peptidmessreihe – Übersicht Shifts und Splits	54
3.18	Peptid-Reihe – Kristallstruktur 1PIN mit Peptid	55
3.19	Chemische Verschiebung: Peptid	56
3.20	K _D -Werte: Peptid	58
3.21	Peptidmessreihe – Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA	60

3.22	Ergebnis des HetNOE	63
3.23	Veränderung der Relaxationszeiten	64
3.24	Relaxationszeiten	65
3.25	Beispiel eines Fits für die Relaxationszeit	66
3.26	Relaxation: Abhängigkeit von τ_c vom M_w	68
4.1	Relaxationsmodell für Pin1	73
4.2	Relaxation: Abhängigkeit von τ_c vom M_w	74
4.3	Strukturvergleich WW-Domänen	80
4.4	Morphing-Sequenzen	83
5.1	Ausblick: Schematische Darstellung des Spin-Labels	87
6.1	Details zum Klon Pin1 _{fl}	94
6.2	Vergleich der Linienbreiten	96
6.3	Peg-Einfluss – Überlagerung der Spektren	97
6.4	Fitergebnisse für die Peaks der Aminosäuren A31 und E35.	98
6.5	Fitergebnisse für die Peaks der Aminosäure T29 und A31.	100

Tabellenverzeichnis

1.1	Die 20 kanonischen Aminosäuren	2
2.1	Auswahl mit NMR messbarer Atomkerne	15
2.2	M9-Medium	28
2.3	LB-Medium	29
2.4	Puffer für die NMR-Messungen	29
2.5	Aufschluss-/Wasch- und Elutionspuffer	29
2.6	Peg-Reihe – Eingesetzte Konzentrationen	31
3.1	Abstände zwischen den Peaks A und B	35
3.2	Temperaturreihe – Energieunterschied zwischen Zustand A+B	38
3.3	Peg-Reihe – Eingesetzte Konzentrationen	40
3.4	Peg400 – Distanzen der Verschiebungen	42
3.5	Peg-Reihe – Gefittete K_D -Werte	44
3.6	Peg-Reihe – Aufspaltende Peaks	46
3.7	Peg-Reihe – Populationsumkehr	48
3.8	Peg-Reihe – Freie Enthalpie zwischen den Zuständen	50
3.9	Peptid-Messreihe – Fitergebnisse	57
3.10	Peptidmessreihe – Energieunterschied zwischen Zustand A+B	61
3.11	Mittelwerte T1/T2	65
3.12	Relaxationsmessung: Tauc Werte	67
4.1	Vergleich von Tauc	75
4.2	Vergleich der K_D -Werte von Peg	77
4.3	Strukturvergleich der WW-Domänen	79
6.1	Peptid- und Pegmessungen – Übersicht aufspaltender Signale	95
6.2	Peg-Messreihe – Fitergebnisse	98
6.2	Peg-Messreihe – Fitergebnisse	99
6.3	Chemische Verschiebung: Peptid	100
6.3	Chemische Verschiebung: Peptid	101
6.3	Chemische Verschiebung: Peptid	102
6.3	Chemische Verschiebung: Peptid	103
6.3	Chemische Verschiebung: Peptid	104
6.4	Peptid-Messreihe – Fitergebnisse	105
6.4	Peptid-Messreihe – Fitergebnisse	106
6.4	Peptid-Messreihe – Fitergebnisse	107
6.4	Peptid-Messreihe – Fitergebnisse	108
6.5	Aufnahmeparameter	109

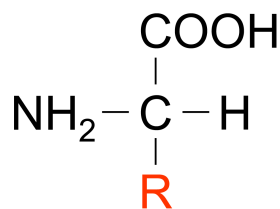
Vorwort

Aminosäuren sind die Bausteine des Lebens. Ihre Anordnung im dreidimensionalen Raum ist Grundlage für die funktionellen Eigenschaften von Proteinen. Um die Wirkungsweise von Proteinen besser verstehen zu können, werden verschiedene Verfahren zur Aufklärung ihrer Strukturen eingesetzt, darunter die Kernspinresonanz (NMR) und die Röntgenstrukturanalyse (RSA). Für letztgenanntes Verfahren ist es zwingend notwendig, Proteinkristalle herzustellen. Die NMR bietet die Möglichkeit, Proteine in gelöster Form zu untersuchen, so dass sie annähernd so vorliegen, wie sie auch in der Zelle und im Organismus vorkommen. In gelöster Form ist es auch möglich, den Einfluss von Liganden oder die Abhängigkeit der Enzymstruktur oder -kinetik von äußeren Bedingungen wie Temperatur oder pH-Wert zu untersuchen. Das Wissen um die Struktur und die Ligandenbindungseigenschaften von Proteinen bieten konkrete Anhaltspunkte für die Entwicklung von Medikamenten. In der vorliegenden Arbeit wurden die Struktur und die Domäneninteraktion von humanem Pin1 untersucht. Pin1 gehört zur Familie der Parvuline und ist eine Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerase (PPIase), die im Zellkern lokalisiert ist. Die erste Struktur des Enzyms wurde 1997 veröffentlicht ([Ranganathan et al., 1997](#)). Das aus der kristallisierten Form gewonnene Ergebnis zeigt zwei Domänen, die über einen flexiblen Linker verbunden sind. Die beiden Domänen interagieren miteinander (geschlossene Form). Die 2003 ([Bayer et al., 2003](#)) von Bayer et. al. veröffentlichte Struktur hingegen ist gestreckt, die Domänen zeigen keine Interaktion (offene Form). Diese Tatsache führte zu der Überlegung, ob im nativen Zustand beide Formen in einem dynamischen Gleichgewicht stehen ([Bayer et al., 2003](#); [Jacobs et al., 2003](#)). Wenn die Geschwindigkeit der Transformation beider Konformationen auf der Zeitskala im Millisekundenbereich liegt, könnte dies mit NMR (Kernspinresonanz) nachzuweisen sein. Ein nächster Schritt ist der Versuch, mit Liganden diese Transformation zu beeinflussen. Sollten die Domänen wirklich interagieren, was die Kristallstruktur von Pin1 und Ergebnisse anderer Messungen nahelegen, sollten sowohl die Temperatur, als auch Liganden die Intensität dieser Domäneninteraktion beeinflussen.

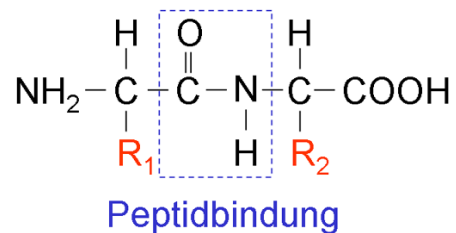
1 Einleitung

1.1 Aminosäuren und Proteine

Es sind 20 sog. proteinogene Aminosäuren bekannt, die genetisch codiert sind und als kanonisch bezeichnet werden. Aminosäuren, die Organismen nicht selbst synthetisieren können und über die Nahrung aufnehmen müssen, werden als essentiell bezeichnet, diejenigen, die ein Organismus selbst herstellen kann, als nicht-essentiell. Mit teilweise essentiell werden Aminosäuren bezeichnet, die nur in bestimmten Situationen mit der Nahrung aufgenommen werden müssen (Alter, Wachstum, Krankheit). Der allgemeine Aufbau einer Aminosäure ist in ►Abb. 1.1(a) dargestellt. Neben min-



(a) Allgemeine Struktur einer Aminosäure



(b) Peptidbindung

Abb. 1.1: Aminosäuren bestehen aus einem zentralen C-Atom, an das neben einem Wasserstoff eine Amino- (-NH₂) und eine Carboxylgruppe (-COOH) sowie ein Rest (R) gebunden sind. Mehrere Aminosäuren können über Peptidbindungen miteinander zu Peptiden verknüpft werden. Lange Peptidketten bis zu 100 Aminosäuren werden als Polypeptide bezeichnet, längere als Proteine.

destens einer Aminogruppe (-NH₂) und mindestens einer Carboxylgruppe (-COOH), die an das zentrale Kohlenstoffatom gebunden sind, besitzen sie einen Rest, der den Aminosäuren ihren Charakter verleiht: hydrophil/hydrophob, sauer/basisch, aromatisch/aliphatisch, polar/unpolar. Für alle proteinogenen Aminosäuren, außer Prolin, ist das zentrale Kohlenstoffatom chiral. Daher ergeben sich zwei mögliche Enantiomere, von denen aber nur die L-Form für die Proteinsynthese relevant ist. Eine Auflistung der wichtigsten Aminosäuren und einiger ihrer Eigenschaften ist in ►Tab. 1.1 zusammengefasst. Mehrere Aminosäuren können über Peptidbindungen ►Abb. 1.1(b) miteinander verknüpft werden. Ketten bis zu einer Länge von 50 oder 100 Aminosäuren werden allg. als Peptide bezeichnet, längere Ketten als Proteine. Die einfache Abfolge mehrerer Aminosäuren hintereinander wird Primärstruktur genannt. Treten

Tab. 1.1: Übersicht der 20 kanonischen Aminosäuren und ihrer Abkürzungen. Die Tabelle gibt außerdem an, welche Aminosäuren für den Menschen essentiell bzw. nicht oder teilweise essentiell sind und welche und welche Polarität sie haben. Verändert nach www.wikipedia.de

Aminosäure	Dreibuchstaben-code	Einbuchstaben-code	Polarität	essentiell ja/nein
Alanin	Ala	A	unpolar	nein
Arginin	Arg	R	polar	teilweise
Asparagin	Asn	N	polar	nein
Asparaginsäure	Asp	D	polar	nein
Cystein	Cys	C	polar	nein*
Glutamin	Gln	Q	polar	nein
Glutaminsäure	Glu	E	polar	nein
Glycin	Gly	G	unpolar	nein
Histidin	His	H	polar	teilweise
Isoleucin	Ile	I	unpolar	ja
Leucin	Leu	L	unpolar	ja
Lysin	Lys	K	polar	ja
Methionin	Met	M	unpolar	ja
Phenylalanin	Phe	F	unpolar	ja
Prolin	Pro	P	unpolar	nein
Serin	Ser	S	polar	nein
Threonin	Thr	T	polar	ja
Tryptophan	Trp	W	polar	ja
Tyrosin	Tyr	Y	polar	nein*
Valin	Val	V	unpolar	ja

*für Kinder essentiell

Aminosäuren innerhalb einer Kette, in Wechselwirkung, können sich geordnete Sekundärstrukturen ausbilden ▶Abb. 1.2. Bei diesen wird u.a. zwischen β -Faltblättern und α -Helices unterschieden. Wechselwirkungen im dreidimensionalen Raum können auch die Ausbildung von Tertiärstrukturen bewirken. Mehrere aneinandergelagerte Tertiärstrukturen bilden eine Quartärstruktur. Die letztgenannten Strukturen verleihen Proteinen und Enzymen ihre Funktion. Enzyme sind Proteine, die biokatalytisch aktiv werden können. Sie regulieren spezifisch chemische Reaktionen im Stoffwechsel, wobei ihre Funktion über die dreidimensionale Anordnung der Aminosäuren definiert ist. So erkennt Pin1 spezifisch phosphorylierte Serine und Threonine, denen in der Sequenz ein Prolin folgt (pSer/Thr-Pro-Bindungen).

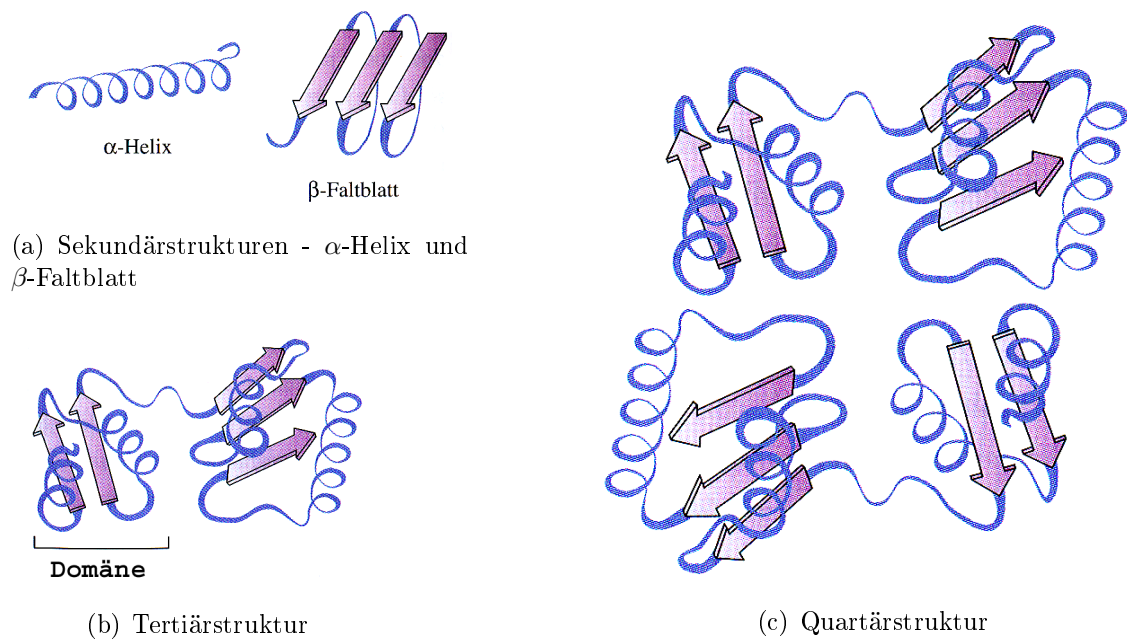
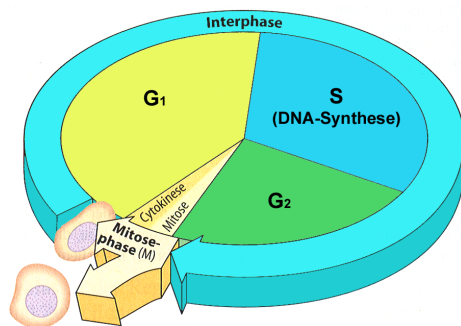


Abb. 1.2: Bei der Anordnung von Aminosäuren im dreidimensionalen Raum können sich geordnete Strukturen ausbilden. Quelle: (Horton et al., 2008)

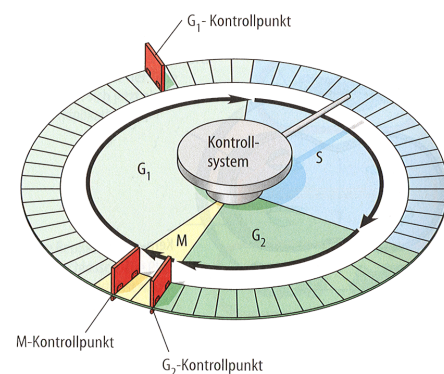
Diese Erkennungssequenzen werden als Motive bezeichnet. Moleküle, die die richtigen Motive besitzen, können von Enzymen erkannt, gebunden und modifiziert werden. So erhöht die Phosphorylierung die Erkennungsrate von Pin1 für das Motiv in etwa um den Faktor 1.300 (Rippmann et al., 2000). Moleküle, die sich an Proteine anlagern, werden im allgemeinen als Liganden bezeichnet, werden sie weiterhin vom Enzym bearbeitet, nennt man sie Substrate. Sowohl strukturelle Veränderungen eines Liganden, wie auch in der Erkennungsregion des Enzyms, können zur Beeinträchtigung des Wechselspiels zwischen beiden Reaktionspartnern beitragen. Kann ein Enzym Substrate nicht mehr binden, weil es sie nicht mehr erkennt, ist seine Funktion beeinträchtigt. Gleiches gilt für den Fall, dass Liganden so verändert werden, dass sie irreversibel an das katalytische Zentrum binden, oder durch ihre Bindung an das Enzym dessen Struktur in der aktiven Region in der Art verändern, dass es nicht mehr funktionell ist. Stoffe, die einen solchen Effekt hervorrufen, werden Inhibitoren genannt und unterscheiden sich in der Bindungsposition und der Art der Inhibition. Für die Pharmaindustrie ist die Anlagerung von Liganden an Enzyme ein wichtiges Forschungsgebiet, denn durch einen Eingriff in die Funktion der Enzyme lassen sich Stoffwechselwege von Patienten und Krankheitserregern beeinflussen und auf diesem Wege neue Medikamente finden.

1.2 Der Zellzyklus

Das Überleben eines Organismus beinhaltet auch die Weitergabe des eigenen genetischen Materials. Die Vererbung der genetischen Informationen erfolgt in prokaryotischen Zellen über die Mitose und in eukaryotischen Zellen über die Meiose, deren zweiter Schritt der Mitose entspricht. In beiden Fällen muss die genetische Information verdoppelt und anschließend je eine Kopie auf jede Tochterzelle übertragen werden. Bei der Meiose werden die Chromosomen zweier verschiedener Elternzellen als haploide Chromosomensätze vererbt, im Gegensatz zur reinen Mitose, über die diploide Chromosomensätze der Mutterzelle vererbt werden. Die biochemischen Vorgänge der Zellteilung innerhalb einer Zelle laufen in geordneter Reihenfolge ab (Loeffler & Petrides, 2002) und bilden einen Zyklus, der in Phasen eingeteilt werden kann ▶Abb. 1.3(a).



(a) Die vier Phasen des Zellzyklus. Verändert nach (Campbell, 2003)



(b) Restriktionspunkte des Zellzyklus. Abbildung entommen aus (Campbell, 2003)

Abb. 1.3: Der Zellzyklus kann in vier Phasen eingeteilt werden: G_1 -, S- und G_2 -Phase und die Mitose. Der korrekte Ablauf der Phasen wird an den Restriktionspunkten kontrolliert.

Die G_1 -Phase (g für „gap“, engl. Lücke) zeichnet sich hauptsächlich durch Wachstum und Synthese von Proteinen aus. Während dieser Phase kann die Zelle in die G_0 -Phase, eine Ruhephase, eintreten, in der sie sich nicht weiter teilt, oder im Anschluß an die G_1 -Phase mit dem Übergang in die S-Phase einen neuen Zellzyklus einleiten. In der S-Phase findet die maßgebliche Replikation der DNA statt. Nach der Replikation muss in der G_2 -Phase überprüft werden, ob die Chromosomen vollständig oder fehlerhaft sind und die Zelle bereitet sich auf die Zellteilung vor, die Mitose (auch als M-Phase bezeichnet). Die G_1 -, S- und G_2 -Phase werden zusammenfassend auch als Interphase bezeichnet. Der Zellzyklus unterliegt einer strikten Kontrolle, damit

sich die Zellen nicht zu früh mit dem Aufbau neuer DNA beginnen oder sich teilen, bevor die DNA-Replikation vollständig abgeschlossen und überprüft wurde. Zur Überwachung eines planmäßigen Ablaufs der einzelnen Phasen dienen sog. Restriktionspunkte, die durch äußere Faktoren und innerhalb der Zelle über die Cycline und Cyclin-abhängigen Proteinkinasen (Cdk) gesteuert werden ▶Abb. 1.3(b). Die Cycline regulieren die Cdks und können diese durch ihre Anlagerung aktivieren, deaktivieren und deren Substratspezifität beeinflussen (Loeffler & Petrides, 2002). Im Komplex mit den Cdks bilden sie als Untereinheit funktionelle Kinasen. Die Aktivität dieser Kinasen wird über Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert. Als eine Phase des Zellzyklus kann die Mitose selbst in vier Phasen eingeteilt werden: Prophase, Metaphase, Anaphase, Telophase.

1.3 Die Parvuline

Die Parvuline bilden zusammen mit den Cyclophilinen und den FK506-bindenden Proteinen (FKBP) die Klasse der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen). Humanes Pin1, im folgenden nur als Pin1 bezeichnet, gehört zur Familie der Parvuline und kommt in allen bisher untersuchten eukaryotischen Zellen vor (Zhou et al., 1999). Alle drei PPIase-Familien sind evolutionär stark konserviert und unterscheiden sich bezüglich ihrer eigenen Regulation und ihrer Substratspezifität. Die Cyclophiline können durch Cyclosporin A (Takahashi et al., 1989) inhibiert werden, FKBP's durch FK506 (Siekierka et al., 1989) sowie Rapamycin (Schreiber et al., 1992) und Pin1 durch Juglon (Hennig et al., 1998). Pin1 zeichnet sich durch seine Spezifität gegenüber phosphorylierten Serin/Threonin-Prolin-Motiven (pSer/Thr-Pro) aus. Über *cis/trans*-Isomerisierung von Prolinen ▶Abb. 1.4, denen ein phosphorylierter Serin- oder Threonin-Rest vorangeht, können die Zielproteine erkannt und aktiviert oder deaktiviert werden. Die bei der Isomerisierung verursachten Strukturveränderungen im Rückgrat der Peptide sind elementar für die Proteinfaltung und auch für die Regulation von Proteinen. In ungefalteten Proteinen liegen nur ca. 10% der Peptidyl-Prolin-Imidbindungen in *cis*-Konformation vor (Fischer et al., 1994). Für die richtige Faltung von Proteinen wird jedoch oftmals ein höherer *cis*-Anteil benötigt. Durch eine Energiebarriere von 75-100 KJ/mol (Braun et al., 2006) verläuft die Isomerisierung ohne PPIasen sehr langsam ab. Den PPIasen kommt an dieser Stelle mit der *cis/trans*-Isomerisierung als einem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Proteinfaltung (Brandts et al., 1975) eine wichtige Aufgabe bei der posttranslationalen Modifikation von Proteinen zu.

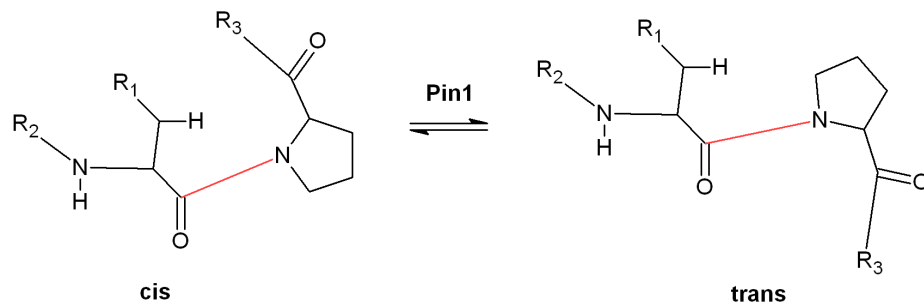


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der *cis/trans*-Isomerisierung durch Pin1.

Weitere Parvuline vom Pin1-Typ wurden in *E.coli* (Par10) (Rahfeld et al., 1994), *Saccharomyces cerevisiae* (ESS1/PTF1) (Engbrecht et al., 1991), der Maus (mPin1), *Drosophila melanogaster* (DODO) (de Couet et al., 1995), *Xenopus laevis* (xPin1), *Aspergillus nidulans* (PINA) (Crenshaw et al., 1998), *Neurospora crassa* (Ssp1) (Kops et al., 1998), *Arabidopsis thaliana* (Pin1At) (Landrieu et al., 2000) und *Schizosaccharomyces pombe* (Pin1p) (Huang et al., 2001) nachgewiesen. Ein Sequenzvergleich der aufgeführten Homologe wird in ►Abb. 1.5 gezeigt. Der Sequenzvergleich zeigt, dass mit Pin1At und Par10 nicht alle Vertreter der Pin-Homologe eine zweite Domäne besitzen. Diese zweite Domäne wird als WW-Domäne bezeichnet, da sie zwei Tryptophane besitzt. Auch die Linker-Region zwischen beiden Domänen ist stark unterschiedlich ausgebildet. Sie beträgt für hPin1 und ESS1/PTF1 9-14 Aminosäuren, für SSP1, PinA und SPCC16CV mehr als doppelt so viele. Die PPIase-Domäne ist stärker konserviert als die WW-Domäne. Das pflanzliche PinAt und Par10 aus *E.coli* besitzen keine WW-Domäne und unterscheiden sich auch in der PPIase-Domäne stärker von den anderen Pin1-Vertretern. Aus diesem Grund werden sie in der Abbildung getrennt aufgeführt und von der Homologieberechnung ausgeschlossen. Die Berechnungen wurden mit dem Clustal W-Algorithmus durchgeführt (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.html). Die WW-Domäne hat nach dieser Berechnung einen Anteil von 39% identischen und ähnlichen Aminosäuren (umfasst identische, ähnliche und sehr ähnliche Aminosäuren). In der PPIase-Domäne ist die Homologie mit 62% höher.

Konservierte Strukturen geben Hinweise auf ihre Bedeutung für die Funktion des Proteins bzw. Enzyms. Allgemein deutet eine stark konservierte Region auf eine Schlüsselstelle in der Struktur hin, die für die Funktion des Proteins unabdingbar oder von höchster Wichtigkeit sind. Mutationen an diesen Stellen können daher zu Einschränkungen der Funktion oder zur Funktionsunfähigkeit führen.

[illegible]

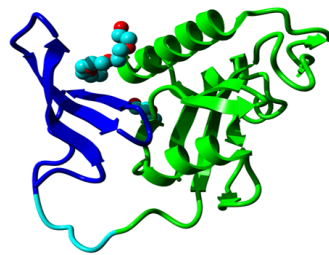
Abb. 1.5: Sequenz-Vergleich von Pin1-Typen. Die Symbole in der unteren Zeile geben Auskunft über den Grad der Konservierung der betreffenden Aminosäure innerhalb der Vergleichssequenzen: „*“ = identisch; „:“ = sehr ähnlich; „.“ = ähnlich. Die Homologe Par10 und PinAt zeigen die größten Unterschiede im Sequenzvergleich und sind daher getrennt aufgeführt (unter dem lilafarbenen Strich). Die Ergebnisse des Sequenzvergleichs (ohne Par10 und PinAt) sind für die WW- und PPLase-Domäne in der Tabelle einzeln aufgeführt. Die GenBank Accession Numbers der Sequenzen von oben nach unten: AAC50492, AAC28408, CAA06818, CAA20742, CAA59961, AAC49984, AB009692, P0A9L5, AAD20122.

(Verändert nach http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.html)

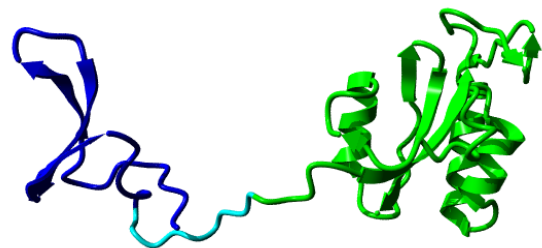
1.4 Struktur und Funktion von Pin1

Pin1 wurde zuerst in Hefezellen in einem „*yeast-two-hybrid screen*“ entdeckt, mit dessen Hilfe Interaktionspartner des Mitoseregulators NIMA (Never In Mitosis gene A) gesucht wurden. Aus diesem Zusammenhang leitet sich auch die Bezeichnung „Pin1“ (Protein Never in Mitosis Gene A Interacting-1) als Interaktionspartner von NIMA ab. NIMA ist für den Eintritt einer Zelle in die Mitosephase essentiell (Oakley & Morris, 1983). In Zellen, in denen NIMA überexprimiert ist, kommt es zum Arrest des Zellzyklus in der Mitosephase. Pin1 wurde später als Suppressor für NIMA identifiziert (Lu et al., 1996). Hinweise auf die Substratspezifität von Pin1 gab die erste Kristallstruktur „1Pin“ (Ranganathan et al., 1997), die mit Hilfe der RSA aufgeklärt und 1996 veröffentlicht wurde. Für die Aufklärung wurde das Protein in Anwesenheit eines Ala-Pro-Dipeptids kristallisiert ▶Abb. 1.7. In der aufgeklärten Struktur ist eine Sulfation in der Nähe des aktiven Zentrums an der β -Methyl-Gruppe des Alanins angelagert. Dieses Sulfat deutete für die Entdecker darauf hin, dass ein saures oder phosphoryliertes Serin oder Threonin am Rest N-terminal zum Prolin als Motiv bevorzugt werden würde. Biochemische Versuche belegten diese These (Yaffe et al., 1997; Kops et al., 1998).

Das Ergebnis der RSA zeigt zwei Domänen, die über einen flexiblen Linker miteinander verbunden sind und aufgrund ihres Aufbaus bzw. ihrer Funktion als WW- und PPIase-Domäne bezeichnet werden ▶Abb. 1.6(a).



(a) Kristallstruktur von Pin1



(b) NMR-Struktur von Pin1

Abb. 1.6: Kristallstruktur (Ranganathan et al., 1997) und NMR-Struktur (Bayer et al., 2003) von Pin1. Die WW-Domäne ist blau gefärbt, der Linker in cyan und die PPIase-Domäne grün. In der Kristallstruktur sind zwei Peg-Moleküle angelagert, von denen sich eines zwischen den Domänen und das andere in dieser Darstellung an der Rückseite der PPIase-Domäne befindet.

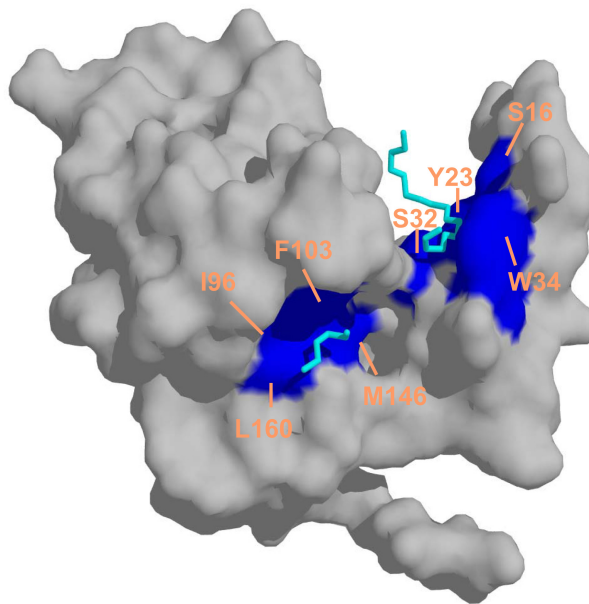
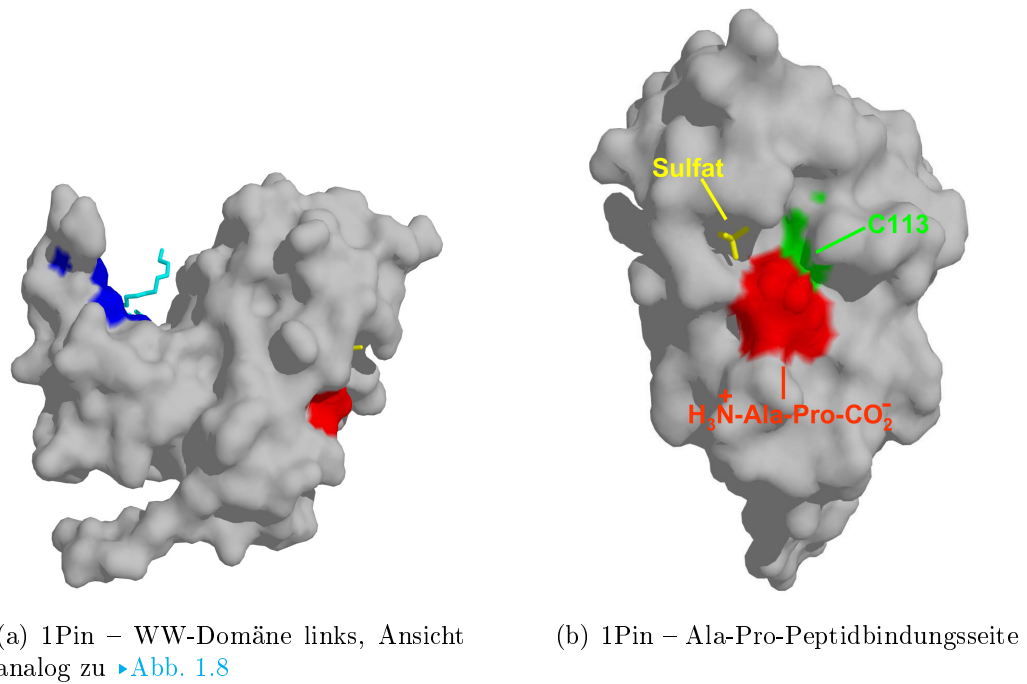


Abb. 1.7: Kristallstruktur 1Pin mit farbig markierten Strukturbereichen. Die hydrophoben Bereiche, in die sich ein Peg-Molekül (cyan) einlagern kann, sind in blau gehalten. Das Sulfat-Ion in der Nähe des aktiven Zentrums (b) um C113 (grün) ist in gelb hervorgehoben. Die Bindungsseite für das Ala-Pro-Dipeptid ist rot eingefärbt. Die hydrophoben Bereiche werden durch die Aminosäuren S16, Y23, S32 und W34 sowie I96, F103, L160 und M146 ausgebildet.

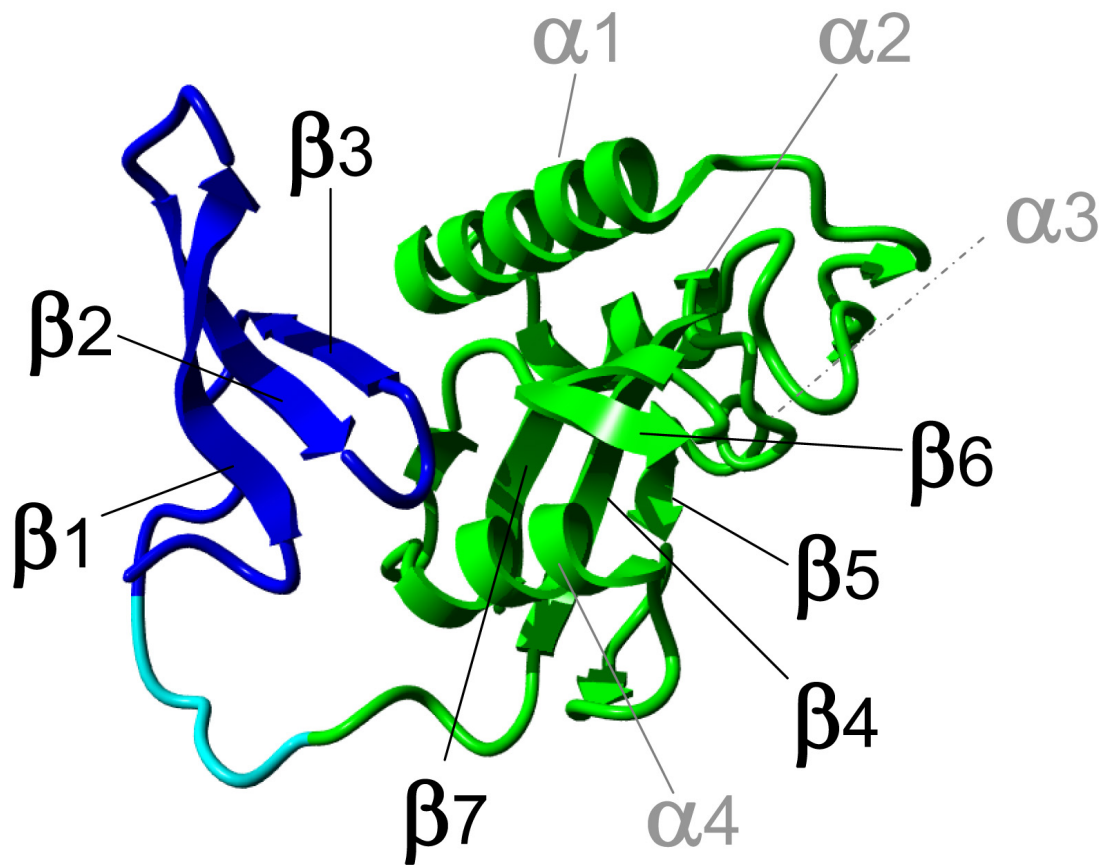


Abb. 1.8: Strukturelemente von Pin1. Die WW-Domäne besitzt die β -Faltblätter β 1-3. Die PPIase-Domäne besitzt neben den β -Faltblättern β 4-7 die Helices α 1-4. Die Zuordnung erfolgte nach (Ranganathan et al., 1997)

Die C-terminale PPIase-Domäne ist strukturell homolog zu anderen in der Klasse FK506-bindender PPIasen und ist innerhalb der Domäne der Eucarya stark konserviert. Die WW-Domäne wird aufgrund ihrer Bindungsregion für pSer/Thr-Pro-Motive als Typ IV-WW-Domäne (Kay et al., 2000) eingestuft. Sie enthält drei antiparallele β -Faltblätter β 1, β 2 und β 3. Über die Linker-Region sind diese mit den Strukturelementen β 4, α 1, α 2, α 3, β 5, α 4, β 6 sowie β 7 in der PPIase-Domäne verbunden. Beide Domänen interagieren über ein gemeinsames Interface. In diesem Bereich bilden die Aminosäuren eine hydrophobe Tasche aus, in der im Kristall ein Peg-Molekül eingelagert ist – Peg wurde als Koagens für die Kristallisation verwendet. Weiterhin werden drei Bereiche hervorgehoben, denen eine funktionelle Bedeutung zukommt ►Abb. 1.7. Dies sind die neben der bereits beschriebenen hydrophoben

Bindungsregion und das katalytische Zentrum um die Aminosäure C113. Die katalytische Funktion von Pin1 erfüllt die PPIase-Domäne. Die Funktion der WW-Domäne ist noch nicht genau geklärt. Die bekannten prokaryotischen Pin1-Homologe (z.B. Par10) besitzen keine WW-Domäne. Erste Hinweise für die Rolle der WW-Domäne geben Messungen mit Deletionsmutanten (Δ WW), in denen nachgewiesen werden konnte, dass die Anwesenheit der gebundenen WW-Domäne für die Lokalisierung von Pin1 im Zellkern nötig ist (Rippmann et al., 2000). Zudem konnte gezeigt werden, dass die WW-Domäne ebenfalls eine Substratbindungsregion sehr ähnlicher Spezifität wie die PPIase-Domäne besitzt, Substrate aber mit höherer Affinität bindet (Yaffe et al., 1997; Lu et al., 1999b). Die isolierte PPIase-Domäne bindet nur wenige Substrate. Die Bindungsaffinität für das komplette Enzym wiederum ist höher, als die für die WW-Domäne (Joseph et al., 2003). Daraus abgeleitet wird der PPIase-Domäne eine stabilisierende Funktion für die Struktur von Pin1 zugeschrieben (Verdecia et al., 2000).

Für die PPIase-Funktion konnte die zentrale Bedeutung des Cystein 113 durch die Austauschmutante C113A bewiesen werden. Diese Mutante kann die Funktion des Pin1-Wildtyps hemmen, indem es die Substrate über ihr pSer/Thr-Pro-Motiv erkennt und bindet, aber unfähig ist, die Isomerisierung durchzuführen (Rippmann et al., 2000).

1.5 Stand der Forschung

Es sind über 30 Zielproteine für Pin1 bekannt, die an der Regulation des Zellzyklus und des Zellwachstums beteiligt sind. Ein Auszug bekannter Pin-Substrate wird in ▶Tab. 1.9 gezeigt. Als *cis/trans*-Isomerase kommt dem Enzym eine wichtige Rolle bei der Steuerung des Zellzyklus zu. Änderungen des Expressionslevels konnten mit schadhaften Beeinträchtigungen des Zellzyklus korreliert werden und wurden bereits als Teil der Pathogenese verschiedener Krankheiten beschrieben. Zu diesen Krankheiten zählen verschiedene Krebsarten wie Brust- (Wulf et al., 2001), Prostata- (Ayala et al., 2003), Darm- (Kim et al., 2005) und Schilddrüsen-Krebs (Nakashima et al., 2004) sowie Asthma (Shen et al., 2005) und neurodegenerative Veränderungen, wie sie bei Alzheimer (Lu et al., 1999a), (Esnault et al., 2006) auftreten. Verschiedene Studien an Hefezellen und tierischen Zellen haben ergeben, dass Pin1 an vielen Stationen des Zellzyklus eine Rolle spielt, darunter beim Wiedereintritt in die G₀-Phase und den Übergängen zwischen G₁/S- und G₂/M-Phase sowie in der Mitose (Crenshaw et al., 1998). Inhibition von Pin1 in HeLa-Zellen verursacht eine Verlangsamung der Mitose und hat eine erhöhte Sterberate (Apoptose) der Zellen zur Folge (Rippmann

et al., 2000). Die Verfasser betonen, dass sie Apoptose ausschließlich in der Interphase, nicht aber während der Mitose beobachtet haben. Auch die Ergebnisse von Winkler et al. (Winkler et al., 2000) in Versuchen mit *Xenopus laevis*-Eierextrakten stützen diese Beschreibung. Sie konnten die Beteiligung von Pin1 am G₂-Replikationskontrollpunkt nachweisen, an dem die Überprüfung der DNA stattfindet. Der Nachweis von Wechselwirkungen mit mitotischen Phosphoproteinen wie Topoisomerase II α , die bei niedriger Pin1-Konzentration weniger phosphoryliert ist, und Komplexen von Pin1 an mitotischer DNA (Xu & Manley, 2007) zeigen, dass Pin1 auch für den Ablauf der Mitose eine Rolle spielt. In verschiedenen Testreihen konnte außerdem gezeigt werden, dass HeLa- und Hefezellen ohne ihre Pin1-Homologe nicht überleben können, es kommt zum Arrest der Mitose. In Untersuchungen mit *Drosophila melanogaster* (Maleszka et al., 1996) und Mäusen (Fujimori et al., 1999) konnten diese Effekte aber nicht nachgewiesen werden. In Pin1-Knockout-Mäusen konnte eine Verlangsamung der Proliferation von Keimzellen (Atchison et al., 2003) festgestellt werden. Ein erhöhtes Expressionslevel von Pin1 hingegen wurde als schädlich für Hefezellen beschrieben und verursacht in Hela-Zellen einen Stillstand in der G₂-Phase des Zellzyklus. Allgemein führt die Abwesenheit von Pin1 in humanen Krebszellen zum Absterben derselben (Lu et al., 1996). Pin1 wird weiterhin als negativer Regulator der Mitose beschrieben. Liegt Pin1 in einem niedrigen Expressionlevel in Zellen von *Aspergillus nidulans* vor, wird der Mitoseregulator NIMA ebenfalls verstärkt exprimiert und es kommt zur Kondensation der Chromosomen (Lu et al., 1996) und zum Zelltod.

Für einige Interaktionspartner von Pin1 wurden Bindungsaffinitäten und Einflüsse auf die Struktur untersucht (Jacobs et al., 2003). Neben Juglon, das irreversibel an Pin1 bindet (Hennig et al., 1998), wird Pintide als einer der stärksten reversiblen Bindungspartner beschrieben (Yaffe et al., 1997). Jacobs (Jacobs et al., 2003) konnte zeigen, dass Pintide sowie Cdc25 und CTD abhängig von der Anwesenheit beider Domänen verschieden stark gebunden werden und leitet aus den Ergebnissen ein „tag and twist“-Modell für die Domäneninteraktion von Pin1 ab. Demnach könnte Pin1 als Teil einer Signalkaskade die von einer Kinase phosphorylierten Ser/Thr-Motive binden und direkt isomerisieren. Für die Funktionalität als „twisting module“ wäre die möglichst freie Beweglichkeit der Domänen grundlegend. Die Domäneninteraktion hat demnach Einfluss auf die Bindungseigenschaften von Pin1 und darüber hinaus auch auf dessen Funktion.

Table 1. Substrates upregulated by Pin1.

	Consequence	Effect of Pin1	References
APP	amyloid precursor protein	reduction of cleavage for amyloid beta	11
CyclinD1	cell cycle control	stabilization	8
Plk1	G2/M transition	phosphorylation and stabilization of Pin1	26
CK2	G2/M transition, checkpoint control	inhibition of kinase activity	107, 108
Emi1	G2/M transition, checkpoint control	accumulation of cyclins	153
Raf-1	signal transduction	dephosphorylation and recycling	154
c-Jun	transcription factor	transactivation	14
c-Fos	transcription factor	transactivation	27
p73	transcription factor	transactivation	29
p53	transcription factor	transactivation	30–32
p65/Rel	transcription factor	transactivation	130
β -catenin	transactivator	nuclear localization	155
AUF	AU-rich element RNA binding protein	stabilization of AU-rich mRNA	22, 23
Synphilin-1	α -synuclein aggregation	Lewy bodies of Parkinson disease	156
Rab4GTP	membrane recycling	inhibition of endocytic membrane transport	157
Gephyrin	microtubule binding	binding the beta subunit of glycine receptors	158
BIM _{EL}	apoptotic inducer	activation of neuronal apoptosis	159
p66Shc	growth factor adaptor, apoptotic inducer	mitochondrial accumulation, apoptosis inducing	160
Neurofilament-H	neurofilament	neurodegeneration	161
Virus molecule			
HBx	promotion of hepatocarcinogenesis	transactivation	162

Table 2. Substrates downregulated by Pin1.

	Consequence	Effect of Pin1	References
APP	amyloid precursor protein	facilitating C99 turnover	10
Tau	microtubule association	regulation of microtubule assembly	9
SRC3	transcription factor	transactivation	28
c-Myc	transcription factor	dephosphorylation	163
RAR α	transcription factor	transactivation	164
IRF3	transcription factor	controlling antiviral responses	165
RNA polymerase II	transcription of mRNA precursors	inhibition of ongoing transcription	54, 55
NIC	transactivator	transactivation	33
Btk	signal transduction (nonreceptor tyrosine kinase)	inhibition of kinase activity	166
Cyclin E	activator of CDKs	multiubiquitylation of cyclin E by SCF ^h Cdc4	167, 168
Che-1	G2/M transition	inhibition of apoptosis	169
Survivin	inhibitor of apoptosis	unknown	170

(a) Von Pin1 hoch- bzw. herunterregulierte Substrate

Table 3. Substrates of Pin1 (the effects of Pin1 on their cellular levels are unknown).

	Consequence	Effect of Pin1	References
Topoisomerase II	G2/M transition	inhibition of CK2-dependent phosphorylation	107, 108
Nek6	G2/M transition	unknown	171
Myt1	G2/M transition	inhibition of mitotic function, not its catalytic activity	172
NIMA	G2/M transition	inhibition of mitotic function, not its catalytic activity	172
Cdc27	G2/M transition	unknown	172
Cdc25	G2/M transition	inhibition of mitotic function, not its catalytic activity	173
Plx1	G2/M transition	unknown	173
Wee	G2/M transition	inhibition of mitosis by inactivation of catalytic function	172, 174
KRMP1	G2/M transition	inhibition of mitotic function	175
NFAT	transcription factor	inhibition of NFAT activation	176
p54nrb	transcriptional control, RNA splicing	unknown	177
Bcl-2	suppressor of apoptosis	unknown	178
Sil	positive regulator of the sonic hedgehog pathway	spindle checkpoint arrest	179
Stat3	transcription factor	promotion of Stat3 transcription activity	180

(b) Substrate mit unbekanntem Effekt von Pin1

Abb. 1.9: Bisher bekannte Substrate von Pin1, die hoch- bzw. herunterreguliert werden, oder von welchen der Pin-Einfluss auf sie noch nicht bekannt ist. Entnommen (Takahashi et al., 2008).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Neben der 1996 veröffentlichten geschlossenen Kristallstruktur 1PIN ([Ranganathan et al., 1997](#)) ▶[Abb. 1.6\(a\)](#), in der beide Domänen miteinander interagieren, wurde 2003 von Bayer ([Bayer et al., 2003](#)) ein Modell vorgestellt, in dem Pin1 in Lösung in beiden Zuständen (offen und geschlossen) vorliegt, die in einem Gleichgewicht stehen. In dieser Arbeit sollen weitere Erkenntnisse darüber gewonnen werden, ob Pin1 tatsächlich in beiden Konformationen vorliegt, und was die funktionelle Relevanz beider Konformationen im Stoffwechsel ist.

Durch Versuche mit Deletionsmutanten, die keine WW-Domäne besitzen, konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit der WW-Domäne nicht ausschlaggebend für die Funktion der PPIase-Domäne ist ([Jacobs et al., 2003](#)). Jedoch hat die Mutante eine niedrigere Umsatzrate als der Wildtyp. Beide Domänen besitzen Bindungsstellen für die Zielproteine, die im katalytischen Zentrum der PPIase-Domäne modifiziert werden können. Daher ist es vorstellbar, dass die WW-Domäne nicht allein für die Lokalisation des Enzyms zuständig ist, sondern darüber hinaus auch die PPIase-Domäne dabei unterstützt, Substrate zu binden. Dadurch trägt sie zur Erhöhung der lokalen Konzentration an Substrat bei und steigert so die Umsatzrate. Weiterhin wäre es möglich, dass die WW-Domäne dabei hilft, das verarbeitete Substrat aus dem katalytischen Zentrum der PPIase-Domäne zu entfernen, und dieses für das nächste Peptid frei zu machen – auch hierdurch erhöht sich die Umsatzrate. Gestützt wird diese Annahme auch durch die Entdeckung von Li et al. ([Li et al., 2005](#)), die berichten, dass Pin1 im Gegensatz zu seinem Hefehomolog ESS1/PTF1 einen sehr flexiblen Linkerbereich zwischen den Domänen besitzt. Ein flexibler Linker erhöht die Wahrscheinlichkeit für eine Domäneninteraktion, indem er die lokale Konzentration der Domänen zueinander erhöht.

Diese Arbeit hat sich der Aufgabe angenommen, den Einfluss äußerer Faktoren wie der Temperatur sowie die Bindung von Liganden mit NMR zu untersuchen und den Einfluss der Faktoren auf die Struktur und Dynamik von Pin1 zu charakterisieren. Der Schwerpunkt liegt dabei auf der Charakterisierung der Domäneninteraktion und der Frage, ob sich das Gleichgewicht beider Konformationen mit Liganden beeinflussen lässt. Für die Untersuchungen wurden humanes Pin1 und Mutanten herangezogen, die in der Linkerregion verändert waren, oder nur eine Domäne besitzen.

2 Material und Methoden

2.1 NMR

Die NMR-Messungen dieser Arbeit wurden zum Großteil am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund an einem Varian Unity Inova 600-Spektrometer mit Triple Resonanz Probenkopf mit Z-Gradientenspule durchgeführt. Nach Fertigstellung der NMR-Einrichtung an der Universität Duisburg-Essen, konnte für höher aufgelöste Spektren und Het-NOE-Messungen das Bruker Avance II™ 700 MHz-Spektrometer mit Cryo-Probenkopf verwendet werden. Hier wurden ^{15}N -HSQCs und Het-NOEs aufgenommen. In den folgenden Abschnitten wird ein kurzer Einblick in die Grundlagen der NMR und der o.g. Messverfahren gegeben.

2.1.1 Grundlagen der NMR

Mit der Kernspinresonanz können Proben untersucht werden, die einen Kernspin besitzen. Jede Kernart schwingt in einem äußeren magnetischen Feld mit einer spezifischen Frequenz. Ändert sich die Umgebung der Kerne, verschieben sich diese Frequenzen. Dadurch können detaillierte Aussagen über die Umgebung der Kerne und letztendlich die Molekülstruktur gemacht werden. Drei der wichtigsten Kernarten für die NMR sind in ▶Tab. 2.1 aufgelistet. Kerne mit ungerader Spinzahl erzeugen in

Tab. 2.1: Auswahl für NMR geeigneter Kerne, die für diese Arbeit relevant sind.

Isotop	Häufigkeit (%)	Sensitivität
^1H	100	1,0
^{13}C	1,1	0,016
^{15}N	0,37	0,001

einem starken äußeren magnetischen Feld um sich herum ein eigenes schwaches magnetisches Feld und verhalten sich wie kleine Stabmagneten ▶Abb. 2.2(a). Sie richten sich im äußeren Magnetfeld B_0 aus. Dabei können sie zwei Zustände annehmen und sich entweder in Richtung des äußeren Feldes orientieren (α) oder entgegengerichtet (β), was energetisch ungünstiger ist ▶Abb. 2.1.

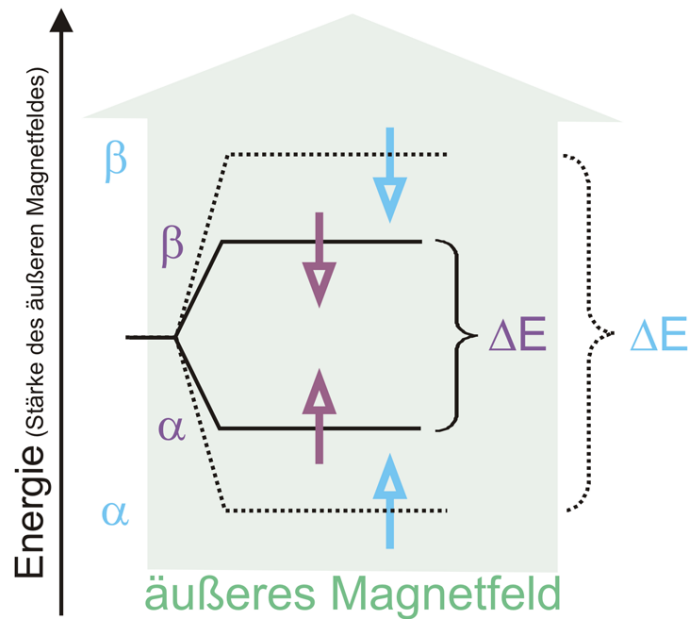


Abb. 2.1: Atomkerne richten sich in einem äußeren Magnetfeld aus. Die Ausrichtung parallel (α) zum äußeren Feld ist energieärmer als eine entgegengesetzte (β) Ausrichtung. Der Energieunterschied ΔE zwischen beiden Zuständen ist abhängig von der Stärke des Magnetfeldes.

Da die Ausrichtung ein Quantenphänomen ist, gibt es keine Zwischenzustände. Mikroskopisch betrachtet, stehen die Populationen der Energieniveaus in einem Fließgleichgewicht, d.h. es wechseln immer gleich viele Spins ihre Orientierung von α nach β wie umgekehrt.

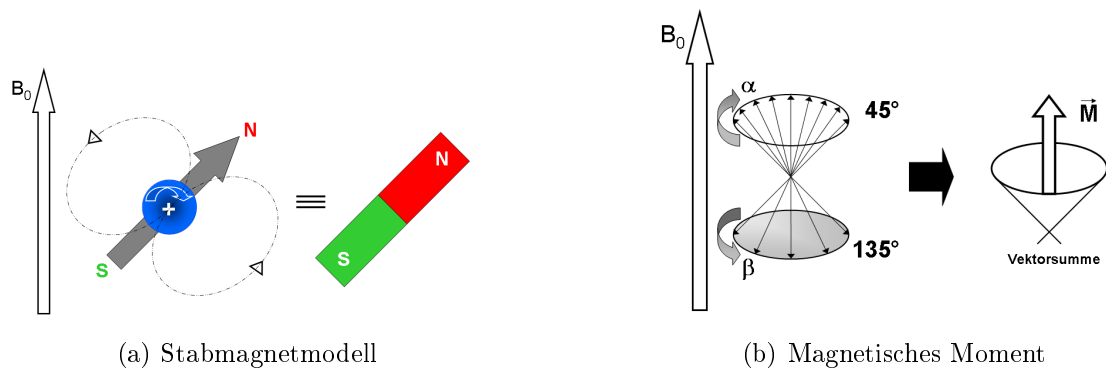


Abb. 2.2: Ausrichtung eines halbzahligen Spins in einem äußeren Magnetfeld. Da sich im Grundzustand mehr Kerne im α -Energieniveau befinden, bildet sich makroskopisch ein magnetisches Moment in Richtung des äußeren Magnetfeldes aus. Abbildung in Anlehnung an (Jacobsen, 2007)

Der energetische Unterschied ΔE zwischen beiden Zuständen steigt mit zunehmenden

der Feldstärke des äußeren Magneten an. Die Energie entspricht einer bestimmten Frequenz elektromagnetischer Strahlung ►Gl. 2.1.

$$\Delta E = \hbar \times \nu_0 = \frac{\hbar \times \gamma \times B_0}{2\pi} \quad ; \quad \hbar = \frac{h}{2\pi} \quad (2.1)$$

ΔE =Energieunterschied zwischen beiden Zuständen, h =Plancksches Wirkungsquantum, ν_0 = Larmorfrequenz in Hz, γ = gyromagnetisches Verhältnis, B_0 = Stärke des äußeren Magnetfeldes

Das Verhalten des Spins ähnelt dem eines schnell drehenden Kreisel, der sich in einem bestimmten Winkel mit einer bestimmten Frequenz, der Larmorfrequenz, um eine Achse dreht. Die Larmorfrequenz (ν_0) dieser Präzession ist von der Feldstärke (B_0) des Magneten abhängig und kann über ►Gl. 2.2 beschrieben werden und kann in der Einheit Hertz pro Tesla angegeben werden.

$$\nu_0 = \frac{\gamma \times B_0}{2\pi} \quad (2.2)$$

ν_0 = Larmorfrequenz in Hz, γ = gyromagnetisches Verhältnis, B_0 = Stärke des äußeren Magnetfeldes

Diese Frequenz kann auch in rad pro Sekunde pro Tesla angegeben werden und wird dann als Winkelgeschwindigkeit (ω) bezeichnet. Die Frequenz ist zugleich spezifisch für jede Sorte von Atomkernen. D.h. jeder Atomkern taumelt in einem bestimmten Winkel θ mit einer bestimmten Winkelgeschwindigkeit ω im Magnetfeld, bei dem Versuch, sich in diesem auszurichten. Wird von außen Energie in Form von Radiowellen eingestrahlt, die in ihrer Frequenz ω entspricht, können die Atomkerne diese absorbieren. Auf diesem Weg werden Energieübergänge induziert. ►Abb. 2.3 zeigt ein Kugelmodell von Atomkernen, die die Energielevel nach Boltzmann ►Gl. 2.3 besetzen.

$$\frac{p_\alpha}{p_\beta} = e^{\left(\frac{E_\beta - E_\alpha}{k \times T}\right)} \quad (2.3)$$

p_α = Anzahl der Kerne im α -Zustand; p_β = Anzahl der Kerne im β -Zustand; $E_{\alpha/\beta}$ =Energie der Kerne im α - bzw. β -Zustand; T = Temperatur; k= Boltzmann-Konstante

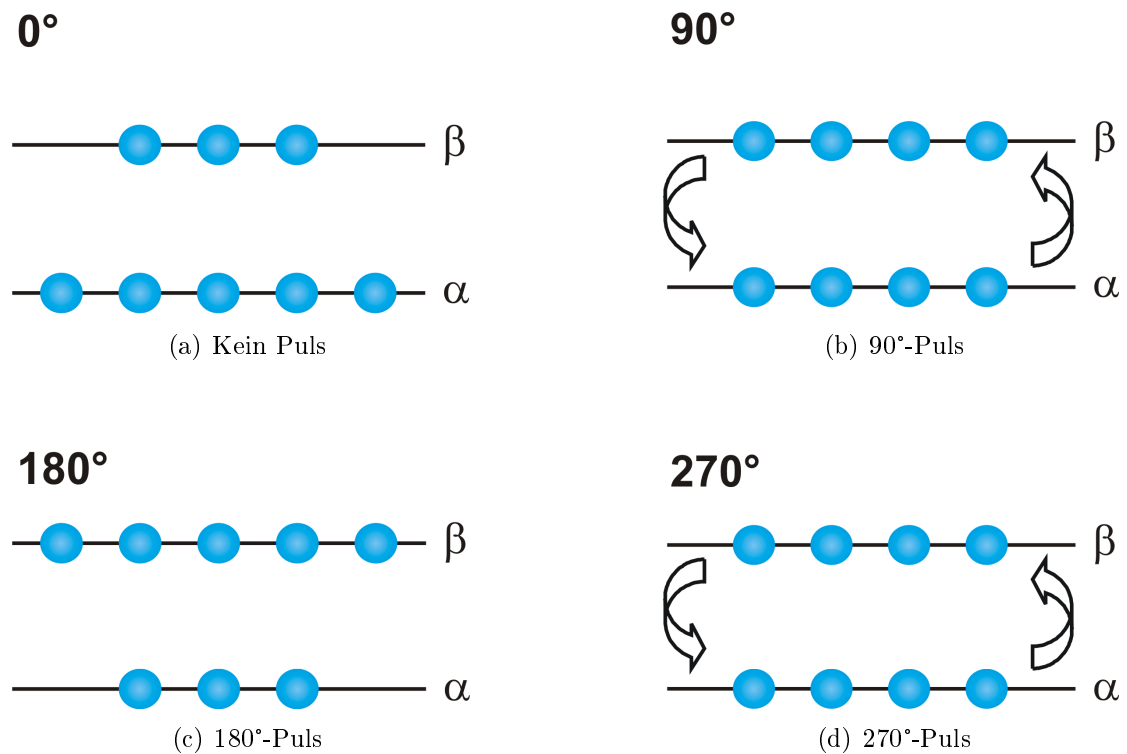


Abb. 2.3: Energielevel, Pulse.

Dabei wird das energetisch günstigere α -Niveau stärker populiert ▶Abb. 2.3(a), wobei $\Delta E > 0$ ist. Durch die geringe Mehrzahl an Spins im α -Zustand, bildet sich ein makroskopisches magnetisches Moment in Richtung des äußeren Feldes aus ▶Abb. 2.2(b). Die Populationen können durch Einstrahlen von Radiowellen beeinflusst werden. Standardmäßig werden Pulse verwendet, die einem Winkel von 90° oder Vielfachen entsprechen. Direkt nach einem 90° -Puls sind die Energieniveaus gleich stark besetzt ▶Abb. 2.3(b) und ΔE wäre gleich Null. Mit einem 180° -Puls kann die Population umgekehrt werden ▶Abb. 2.3(c), eine Messung direkt im Anschluß würde negative Intensitäten ergeben. Ein 270° -Puls entspricht einem 90° -Puls ▶Abb. 2.3(d). Die eigentliche Messung besteht daher aus einer Reihe von Pulsen, die zum einen für die Phasenkohärenz sorgen, damit eine gerichtete Magnetisierung entsteht, und zum anderen die Ausrichtung im äußeren Magnetfeld beeinflussen und der Energieübertragung zwischen Kernen innerhalb der Probe, um die gewünschten Eigenschaften messen zu können. Vektordarstellungen in einem kartesischen Koordinatensystem helfen bei der Vorstellung, wie sich die magnetischen Momente der Atomkerne im Magnetfeld ausrichten ▶Abb. 2.4.

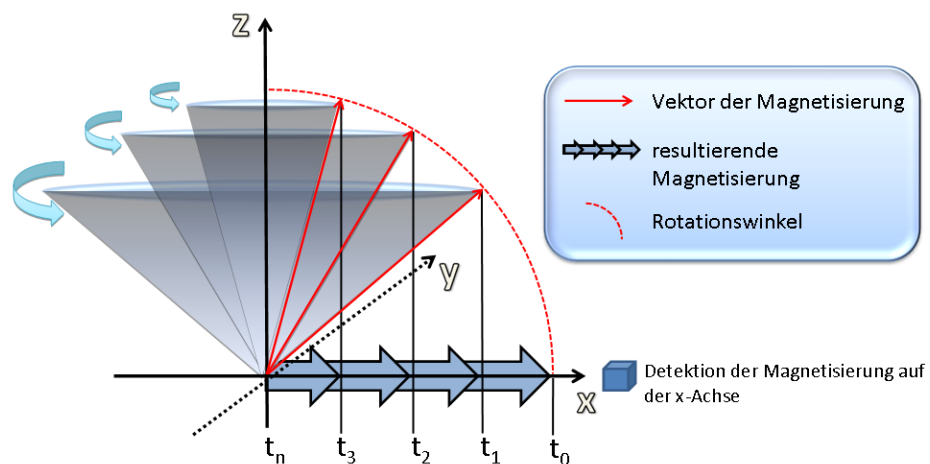


Abb. 2.4: Resultierende Magnetisierung nach einem Puls. Nach einem 90° -Puls ist die Magnetisierung entlang der x -Achse gerichtet. Mit der Zeit verliert sie an Intensität.

Das äußere Hauptfeld wird auf der z -Achse aufgetragen und mit B_0 bezeichnet. Wird ein 90° -Puls auf eine im äußeren Magnetfeld ausgerichtete Probe gegeben, kippt der Vektor der Magnetisierung in die x - y -Ebene. Eine Messung direkt nach dem 90° -Puls (t_0) ergibt maximale Signalintensität. Mit der Zeit richten sich die magnetischen Momente der Atomkerne wieder im äußeren Feld Richtung z -Achse, um die sie präzidieren. Gleichzeitig geht die Phasenkohärenz verloren und der Vektor in der x - y -Ebene wird kleiner (t_0, t_{1-3}), bis er nicht mehr detektierbar ist (t_n) und sich die Kerne wieder in ihrem energetischen Ausgangszustand befinden.

Die Magnetisierung über die Zeit in x -Richtung wird durch eine Sinusfunktion beschrieben. Das Signal wird als Free Induction decay (FID) bezeichnet. Sind in der Probe verschiedenartige H-Kerne vorhanden, die unterschiedliche Nachbaratome besitzen, so setzt sich das Signal aus übereinandergelagerten Sinusfunktionen zusammen. Zur Darstellung eines NMR-Spektrums werden die zeitlichen Sinusfunktionen mittels Fourier-Transformation in einer Funktion über einer Frequenzachse dargestellt.

Das NMR-Signal (FID) ist sehr schwach und enthält zudem einen hohen Anteil an Rauschen. Um das Rauschen zu minimieren und die eigentlichen Signale zu maximieren, ist es gerade bei mehrdimensionalen Spektren (2D, 3D...) nötig, mehrere FIDs mit einer bestimmten Anzahl an Scans (ns = engl. number of scans) aufzunehmen. Da Rauschen zufällig ist, wächst es beim Aufsummieren der Signale langsamer, als das eigentliche Signal. Um die Güte eines Signals in Bezug auf das Hintergrundrauschen zu beschreiben, wird das Signal-Rauschverhältnis (S/N) angegeben. Das S/N steigt nach ►Gl. 2.4 mit der Quadratwurzel der Anzahl an Scans.

$$\frac{S}{N} = \sqrt{n} \frac{S_x}{N_x} \quad (2.4)$$

$\frac{S_x}{N_x}$ = Signal-Rausch-Verhältnis vor der Mittelung; $\frac{S}{N}$ = Signal-Rausch-Verhältnis nach der Mittelung;
n = Anzahl Scans

Mit einer hohen Anzahl an Scans können daher Spektren mit einem sehr guten S/N erzielt werden, aber es ist zu beachten, dass mit jedem Scan größere Datensätze entstehen. Um gute Ergebnisse in angemessener Zeit zu erzielen, wurden in dieser Arbeit die meisten 2D-Spektren mit einer Auflösung von 1024×512 Punkten mit differierenden Scanzahlen aufgenommen.

2.1.2 Chemische Verschiebung, Austausch und Koaleszenz

Moleküle, deren Kerne wir im NMR beobachten, sind verschiedenen Arten der Bewegung unterworfen. Sie zeigen interne Bewegung, Vibrationen, die die Geometrie des Moleküls beeinflussen. Diese laufen aber so schnell ab ($10^{12} - 10^{14}$ Hz), dass sie nur sehr geringen direkten Einfluss auf ein Spektrum haben (Harris, 1986). Bewegung des Moleküls im Raum laufen langsamer ab und können sich auf die Signale auswirken. Durch diese Bewegung kann sich die chemische Umgebung der Kerne ändern, z.B. bei der Einstellung dynamischer Gleichgewichte, zu denen auch reversible Konformationsänderungen zählen können. Besteht für einen Kern ein Gleichgewicht zwischen zwei Zuständen A und B, die seine chemische Umgebung verändern, haben diese eine unterschiedliche Resonanzfrequenz (ν_A und ν_B). Sie stehen im zeitlichen Austausch und es findet chemischer Austausch statt. Bei Konformationsänderungen kann das der Fall sein, wenn ein Kern anschließend andere Kerne als Nachbarn hat. Durch den Austausch verändern sich die Signale der am Austausch beteiligten Aminosäuren in der Art, dass sie aufspalten und sich verschieben können. Detektierbar ist die Veränderung, wenn sie nicht zu schnell abläuft und Zustand A und B getrennt voneinander auflösbar sind. Dann befinden sich die Kerne bezogen auf die Differenz der einzelnen Frequenzen ($\Delta\nu$) im langsamen Austausch „slow exchange“ ▶Abb. 2.5. Beide Zustände zeigen je einen Peak im Spektrum, wobei beide Peaks deutlich voneinander getrennt sind. Durch Erhöhung der Temperatur, kann die Austauschrate beschleunigt werden. Mit zunehmender Temperatur laufen dann die Peaks beider Populationen in den Spektren aufeinander zu, während dabei ihre Breite auf halber Höhe zu- und die Signalthöhe abnimmt ▶Abb. 2.5 (a)+(b). Über den „intermediate exchange“ ▶Abb. 2.5 (c)+(d) wird das System schließlich in den „fast exchange“ ▶Abb. 2.5 (e)+(f) überführt, in dem nur noch ein Peak zu erkennen ist, der sich zwischen den beiden ursprünglich voneinander getrennt stehenden erhebt. Durch weiteren Energieeintrag nimmt die Peakbreite wieder ab, die Peakhöhe zu. Eine hohe Austauschrate k deutet

auf einen schnellen Wechsel beider Zustände hin, ein kleines k auf langsam ablaufende Veränderungen, in denen beide Zustände lange genug bestehen, um sie detektieren zu können. Beim „slow exchange“ ist die Linienverbreiterung direkt proportional zur

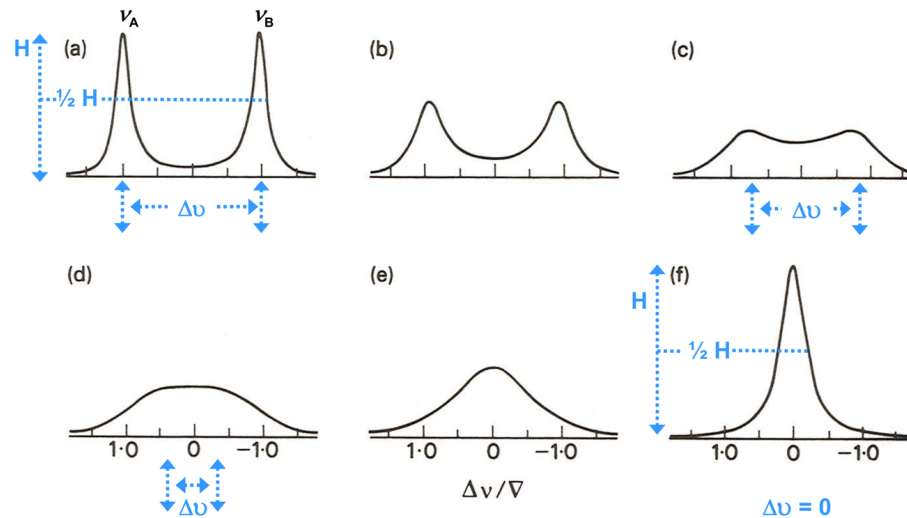


Abb. 2.5: Chemischer Austausch zwischen zwei Signalen ν_A und ν_B . Je größer die Austauschrate k desto weiter wandern die Peaks aufeinander zu und Δd nimmt ab (a-d). Gleichzeitig wächst die Peakbreite auf halber Höhe, die Signalthöhe H nimmt dabei ab. Über den mittleren Austausch, der langsam zur Verschmelzung von ν_A und ν_B führt, geht das System bei steigender Temperatur in den schnellen Austausch über und es ist nur noch ein Signal zu erkennen (e) + (f). Verändert nach (Harris, 1986).

Austauschrate ►Gl. 2.5, beim „fast exchange“ ist sie umgekehrt proportional ►Gl. 2.6.

$$\Delta\nu = \frac{k}{\pi} \quad (2.5)$$

$$\Delta\nu = \frac{\pi \times (\delta\nu)^2}{2} \times \frac{1}{k} \quad (2.6)$$

$\Delta\nu$ = Differenz der Peakbreite auf halber Höhe; k = Austauschrate; $\delta\nu$ = Differenz aus ν_A und ν_B

Von der chemischen Umgebung hängt die Magnetisierbarkeit der Atomkerne ab. Verschiebungen in Spektren (Shifts) haben ihre Ursache in der unterschiedlichen Magnetisierbarkeit von Atomkernen gleicher Art in einem äußeren Magnetfeld. Diese wird als *magnetische Suszeptibilität* bezeichnet und geht auf die Ab-/Entschirmung der Kerne durch die sie umgebenden Elektronen zurück, die eine chemische Umgebung mit eigenem, im Vergleich zum Hauptfeld sehr schwachen, Magnetfeld ausbilden. Bindet ein Ligand an das Protein, erfahren die Kerne an der Bindungsstelle eine Veränderung der chemischen Umgebung. Weiterhin können über die Bindung Struk-

turveränderung induziert werden, die sich auf das Spektrum auswirken. Diese sind meist nicht lokal auf die Bindungsstelle beschränkt. Zusammengefasst lässt sich dies in ►Gl. 2.7 ausdrücken.

$$\text{Verschiebung} = A \times [\text{direkte Bindung}] + B \times [\text{induzierte Strukturänderung}] \quad (2.7)$$

Wie hoch der jeweilige Anteil der Einflussfaktoren auf das Signal ist, kann nicht genau geklärt werden, da beide Effekte zeitgleich einwirken und sich in ihrer Wirkung überlagern.

Werden dem zu untersuchenden Protein Liganden in bekannter Konzentration zutitriert, können aus den Verschiebungen mikroskopische (s.u.) Dissoziationskonstanten (K_D) berechnet werden ►Gl. 2.8. Diese sagen etwas über die Dauer der Anlagerung eines Liganden an ein Zielprotein aus. Je besser der Ligand bindet, desto kleiner ist der K_D , da die Dissoziation langsamer verläuft, als bei einem schlechten Binder. Für den „*Least-Square-Fit*“ (Fit über die kleinsten Fehlerquadrate) dürfen die Variablen K_D und ΔF_{max} verändert werden. Zu den Ergebnissen werden auch immer die Standardabweichungen mit angegeben.

$$I = F_0 + \Delta F_{max} \times \frac{E_0 + L_0 + K_D}{2} - \sqrt{\left(\frac{E_0 + L_0 + K_D}{2}\right)^2 - L_0 \times E_0} \quad (2.8)$$

I =Intensität; F_0 =Signal des Liganden; ΔF_{max} =Max. Signalintensität bei Sättigung; E_0 =Konzentration des Enzyms (Pin1); L_0 =Konzentration des Liganden; K_D =Dissoziationskonstante

Bei der Berechnung über die Verschiebung werden die Dissoziationskonstanten in ihrem Wert durch Term zwei in ►Gl. 2.7 verfälscht. Umso geringer die Strukturbindungseffekte, desto genauer beschreibt die Gleichung demnach K_D als reine Dissoziationskonstante. Diese ist mikroskopisch und gilt für die einzelne Aminosäure, für die sie gefittet wurde. Sind die Ligandeneinflüsse auf verschiedene Aminosäuren ähnlich, so ähnelt sich ihr K_D . Eine große Anzahl an gleichen Werten in benachbarten Regionen der Struktur eines Proteins, kann eine makroskopische Dissoziationskonstante für diesen Bereich definieren. Stellt dieser Bereich das Bindungszentrum des Proteins dar, kann der Wert als K_D für das ganze Protein betrachtet werden.

2.1.3 ^{15}N -HSQCs

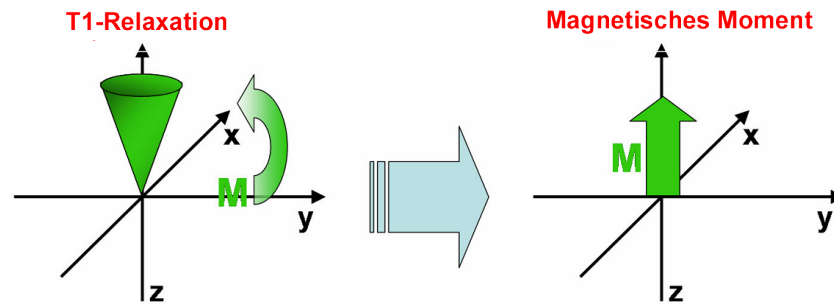
^{15}N -HSQCs zeigen alle Korrelationen zwischen ^{15}N - und ^1H -Kernen der Amidgruppen eines Proteins. Neben den Signalen für die Amidgruppen des Proteinrückgrats, können auch die der Seitenketten von Trp ($\text{N}\epsilon\text{-H}\epsilon$) und die Seitengruppen von Asn

und Gln ($N\delta\text{-H}\delta 2/N\epsilon\text{-H}\epsilon 2$) sichtbar sein¹(Zuordnung nach IUPAC). In ^{15}N -HSQC-Spektren erhält man für fast alle Aminosäuren des Proteins ein Signal. Veränderungen, die sich auf die Struktur des Proteins und somit auf die Aminosäuren auswirken, können in übereinandergelagerten Spektren aus Messreihen, in denen eine Bedingung verändert wurde (z.B. die Temperatur oder durch Zugabe von Liganden), sichtbar werden, z.B. in Form von Signalerschiebungen. Nach Zuordnung der Signale zu den einzelnen Amidprotonen der Aminosäuren der Proteinprobe, können auf diesem Weg direkt die Bereiche eines des Proteins identifiziert werden, die beeinflusst werden.

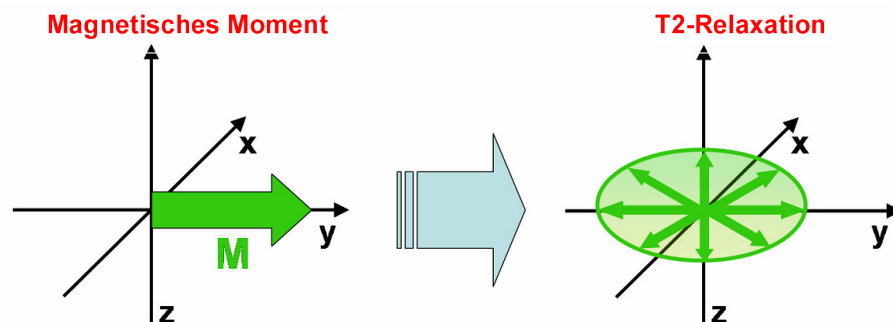
2.1.4 Relaxationsmessungen

Relaxation bedeutet Entspannung. Die angeregten Spins kehren in ihren Ruhezustand zurück, und die Zeit, die sie dazu benötigen, lässt charakteristische Beschreibungen der untersuchten Moleküle zu. Es wird zwischen zwei Arten von Relaxation unterschieden, der Spin-Gitter-Relaxation (T_1) und der Spin-Spin-Relaxation (T_2). Die T_1 -Relaxation ist makroskopisch betrachtet die Rückkehr in den Ausgangszustand in Richtung des Hauptmagnetfeldes z ▶Abb. 2.6(a). Mikroskopisch beschreibt sie die Rückkehr in das Gleichgewicht zwischen α - und β -Zustand. Die T_1 -Zeit gibt an, wie lange es dauert, bis nach Anregung wieder 63% der Energie des Grundzustandes erreicht sind. Bei großen Molekülen ist T_1 kleiner, da mehr Atome zur Verfügung stehen, um die während der Relaxation abgegebene Energie aufzunehmen. Die T_1 -Relaxation ist am schnellsten, wenn die Bewegungen des Kerns der Larmorfrequenz entsprechen. Die T_2 -Relaxation beschreibt die mit der Zeit abnehmende Phasenkohärenz der Spins in der x,y -Ebene ▶Abb. 2.6(b). Die Kerne geben dabei ihre Energie nicht an die Umgebung ab, sondern tauschen diese mit benachbarten Kernen aus. Mit der Zeit geht daher die gerichtete Magnetisierung in der x,y -Ebene verloren. Je mehr Protonen vorhanden sind, desto schneller verläuft der Verlust der Phasenkohärenz. Das Verhältnis von T_1/T_2 kann direkt mit dem Molekulargewicht korreliert werden. Neben dem Spin-Spin-Energieaustausch können auch weitere Effekte zu einer Abnahme der Phasenkohärenz führen. Darunter z.B. statische Magnetfeldinhomogenitäten. Zusammen mit T_2 werden diese Einflüsse in T_2^* zusammengefasst. Der Verlauf der Intensitäten der Messsignale in Abhängigkeit der Relaxationszeiten kann mathematisch wie folgt beschrieben ▶Gl. 2.9 (Kay et al., 1992) werden.

¹<http://www.protein-nmr.org.uk/spectra.html>



(a) Prinzip der T1-Relaxation



(b) Prinzip der T2-Relaxation

Abb. 2.6: Prinzip der T1- und T2-Relaxation. T1 beschreibt die Rückkehr der Magnetisierung M in Richtung des Hauptmagnetfeldes unter Abgabe von Energie an die Umgebung. T2-Relaxation beschreibt den Energieaustausch der Spins untereinander, ohne Abgabe von Energie an die Umgebung. Dabei geht die Phasenkohärenz mit der Zeit verloren (Bildquelle: (Sinnen, 2004)).

$$I = I_0 \times e^{-\frac{\tau}{T_1/2}} \quad (2.9)$$

I =Intensität; I_0 =Intensität im Grundzustand; τ =Relaxationszeit

Im Zusammenhang mit Relaxationszeiten werden oft die sog. „Relaxationsraten“ R_1 und R_2 angegeben, die sich aus den Kehrwerten von T_1 und T_2 errechnen. In dieser Arbeit werden aber immer die T_1 - und T_2 -Werte selbst angegeben. Für die Bestimmung von T_1 und T_2 werden nacheinander Messungen mit τ und Vielfachen von τ durchgeführt. τ ist die Zeit zwischen zwei Pulsen, die es den angeregten Kernen ermöglicht, in den Grundzustand zurückzukehren, bevor der nächste Anregungspuls erfolgt und liegt im Bereich von Millisekunden (ms) bis Sekunden (s).

2.1.5 Kern-Overhauser Effect (NOE)

Ein NOE kann zwischen zwei räumlich benachbarten Wasserstoffkernen A und B auftreten, wenn diese nicht weiter als 5 Å voneinander entfernt sind. Je kürzer die Di-

stanz, desto größer ist der messbare Effekt. Dabei wird Energie von Kern A über den Raum auf Kern B übertragen, so dass dessen Signalintensität beeinflusst wird. Da der Effekt distanzabhängig ist, können über ihn Entfernungen zwischen zwei Kernen bestimmt werden. Der Einfluss von Kern A auf das Signal des Kerns B ist dem Kehrwert der sechsten Potenz des halben Abstandes (r =Radius) $\frac{1}{r^6}$ proportional. Der Abstand zwischen den austauschenden Kernen kann auf diesem Weg genau abgeschätzt werden. NOE-Effekte sind eine der Hauptursachen der T2-Relaxation ▶[Kap. 2.1.4](#), die eine Abnahme der Phasenkohärenz durch internuklearen Energieaustausch beschreibt. Um einen NOE zwischen zwei verschiedenen Kernen wie ^{15}N und ^1H (HetNOE) detektieren zu können, werden zwei Spektren aufgenommen, wobei in einem Fall die Energieübergänge gesättigt werden und in dem anderen Fall nicht. Ein Vergleich der Intensitäten beider Spektren zeigt, welche Kerne einen NOE erfahren. In einem Protein werden die Aminosäuren, die in geordneten 3D-Strukturen lokalisiert sind, Energie mit mehreren Nachbarkernen austauschen. Wird Kern A gesättigt, überträgt er Energie auf Kern B, wodurch dessen Intensität beeinflusst wird. Neben Aussagen zu intramolekularen Abständen, können aus dem Verhältnis der Populationen der gesättigten (P_{sat}) und der ungesättigten Signale P_{unsat} Rückschlüsse auf die freie Beweglichkeit der Aminosäuren gezogen werden. So deuten Werte von $\frac{P_{\text{sat}}}{P_{\text{unsat}}} < 0,65$ (gilt für Aufnahmen an einem 600 MHz-Spektrometer) auf starke interne Bewegung hin.

2.2 Datenauswertung und verwendete Software

Für die Auswertung der Spektren wurden verschiedene Softwarepakete verwendet. Das Prozessieren der Varian-Daten erfolgte mit *nmrPipe*², die der Bruker-Daten mit *Topspin 2.0*. Die weitere Auswertung erfolgte mit *Sparky*³. Beim Import von Bruker-Daten in Sparky gehen teilweise die Faktoren für den *Receiver-Gain* (rg) verloren. Um Messreihen untereinander vergleichen zu können, muss der rg-Faktor ermittelt (Verweis auf Textstelle) und bei der Auswertung wieder mit in die Daten eingerechnet werden. Für Berechnung der Dissoziationskonstanten (K_D) wurde von mir ein Matlab⁴-Skript geschrieben, die Fit-Ergebnisse wurden anschließend mit Excel⁵ weiter ausgewertet und in Form von Diagrammen grafisch aufbereitet.

Das Auslesen der Daten erfolgte über die *Peaklist*-Funktion der Software Sparky. Abstände und Verschiebungen von Signalen im 2D-Spektrum können nicht direkt über

²Delaglio1995, NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. (Delaglio et al., 1995)

³T. D. Goddard and D. G. Kneller, SPARKY 3, University of California, San Francisco

⁴Mathworks, Matlab V.7, R14

⁵Microsoft Office 2003, Excel

Pythagoras ausgerechnet werden, da die Spektralen Breiten (sw=engl. „sweep width“) der ^1H - und ^{15}N -Achsen nicht gleich sind. Daher ist es notwendig, die ppm-Werte mit einem Faktor von 0,154 anzugleichen (Ayed et al., 2001), woraus sich ►Gl. 2.10 ergibt.

$$\Delta_R = \sqrt{\Delta_{^1\text{H}}^2 + (0,154 \times \Delta_{^{15}\text{N}}^2)} \quad (2.10)$$

Δ_R =Shift-Range; $\Delta_{^1\text{H}}$ =Verschiebung auf der ^1H -Achse; $\Delta_{^{15}\text{N}}$ =Verschiebung auf der ^{15}N -Achse

Für die Darstellung der Strukturen wurden die Programme Yasara (www.yasara.org) und Pymol (pymol.sourceforge.net/) verwendet.

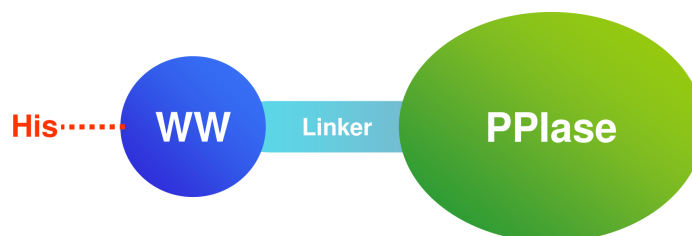
2.3 Verwendete Pin1-Konstrukte

2.3.1 Überblick über die Konstrukte

Die DNS-Sequenzen sämtlicher Pin1-Klone wurden in das Plasmids Pet28a(+) kloniert und im *E.coli*-Stamm *Rosetta* exprimiert. Details zu dem Konstrukt Pin1_{fl} sind im Anhang beigefügt ►Kap. 6. Im folgenden wird ein Überblick über den Aufbau und die Proteinsequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Pin1-Varianten gegeben:

2.3.1.1 Pin1_{fl}

Abb. 2.8: Konstrukt Pin1_{fl}. His steht für einen *His-tag* aus sechs Histidinen, der für die Reinigung des Proteins benötigt wird.

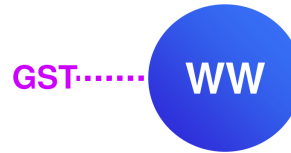


Aminosäuresequenz von Pin1_{fl}. Die Zahlen bezeichnen die Nr. der Aminosäuren im Zehnerintervall.

10	20	30	40	50
MADEEKLPPG	WEKRMSRSSG	RVYYFNHITN	ASQWERPSGN	SSSGGKNGQG
60	70	80	90	100
EPARVRCSHL	LVKHSQSRRP	SSWRQEKITR	TKEEALELIN	GYIQIKISGE
110	120	130	140	150
EDFESLASQF	SDCSSAKARG	DLGAFSRGQM	QKPFEDASFA	LRTGEMSGPV
160	170			
FTDSGIHIIL	RTE			

2.3.1.2 Pin1_{WW}

Abb. 2.9: Konstrukt Pin1_{WW}. **GST** steht für *Glutathion-S-Transferase-tag*, der für die Reinigung des Proteins benötigt wird.

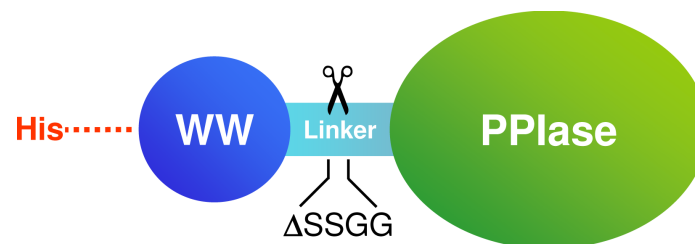


Die Aminosäuresequenz von Pin1_{WW} entspricht denen der Aminosäuren 6-39 von Pin1_{fl}.

10	20	30	40
KLPPGWEKRM	SRSSGRVYYF	NHITNASQWE	RPSG

2.3.1.3 shortPin1

Abb. 2.10: Konstrukt shortPin1



Gegenüber Pin1_{fl} wurden die Aminosäuren 51-54 aus der Linker-Region entfernt. Die ungefähre Position ist in dieser Abbildung mit einer Schere gekennzeichnet. Aminosäuresequenz shortPin1:

10	20	30	40	50
MADEEKLPPG	WEKRMSRSSG	RVYYFNHITN	ASQWERPSGN	SKNGQGEPAR
60	70	80	90	100
VRCSHLLVKH	SQSRRPSSWR	QEKITRTKEE	ALELINGYIQ	KIKSGEEDFE
110	120	130	140	150
SLASQFSDCS	SAKARGDLGA	FSRGQMOKPF	EDASFALRTG	EMSGPVFTDS
160				
GIHIILRTE				

2.4 Proteinexpression und Reinigung

2.4.1 Verwendete Medien und Puffer

2.4.1.1 Medien

Tab. 2.2: M9-Medium

Substanz	Summenformel	Mw [g/mol]	m [mg]
5×M9			
di-Natriumhydrogenphosphat · 7 H ₂ O	Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O	268,07	85,50
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	136,09	15,00
Natriumchlorid	NaCl	58,44	2,50
Ammoniumchlorid	NH ₄ Cl	53,49	5,00
Ammoniumchlorid (¹⁵ N)	¹⁵ NH ₄ Cl	53,49	2,00
mit VE auf 1 Liter auffüllen und autoklavieren, anschließend steril dazu:			
Magnesiumsulfat	MgSO ₄	120,37	240,70
Eisencitrat	C ₆ H ₅ FeO ₇	244,90	
Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,16	4000,00
Calciumchlorid · 2 H ₂ O	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	147,02	14,70
VitB1 (Thiaminchlorid-hydrochlorid)	C ₁₂ H ₁₈ C ₁₂ N ₄ OS · H ₂ O	337,27	
TS2			
Zinksulfat · 7 H ₂ O	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	287,53	100,00
Manganchlorid · 4 H ₂ O	MnCl ₂ · 4 H ₂ O	197,91	30,00
Borsäure	H ₃ BO ₃	61,83	300,00
Cobaltchlorid · 6 H ₂ O	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	237,93	200,00
Nickelchlorid · 6 H ₂ O	NiCl ₂ · 6 H ₂ O	237,7	20,00
Kupferchlorid · 2 H ₂ O	CuCl ₂ · 2 H ₂ O	170,48	10,00
Natriummolybdat · 2 H ₂ O	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	241,95	900,00
Natriumselenit	Na ₂ SeO ₃	172,9	20,00

Für die Expression der Proteinproben, die mit NMR untersucht werden, wurde M9-Minimalmedium ▶Tab. 2.2 mit markiertem Ammoniumchlorid verwendet. Bei der Herstellung des Mediums wird zunächst die erste Komponente (5×M9) angesetzt und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren werden die restlichen Stoffe zugesetzt. Für Vorkulturen und unmarkierte Proben wurde LB-Medium verwendet.

Tab. 2.3: LB-Medium

Substanz	m [g]
Trypton/Pepton	10 g
Bacto-Yeast	5 g
NaCl	10 g

2.4.1.2 Puffer

Tab. 2.4: Puffer für die NMR-Messungen

Substanz	Summenformel	Mw [g/mol]	c [mM]
Kaliumphosphat	$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$	100	
Kaliumsulfat	K_2SO_4	174,27	50
DTT	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$	154,25	1
EDTA	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$	372,24	5

Tab. 2.5: Aufschluss-/Wasch- und Elutionspuffer. Eluiert wurde über einen Gradienten von 1-100% Elutionspuffer gegen Waschpuffer.

Substanz	Summenformel	Mw [g/mol]	Aufschluss	Waschen	Elution
				c [mM]	
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	136,09	50	50	50
di-Kaliumhydrogenphosphat	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	228,23	50	50	50
Kaliumsulfat	K_2SO_4	174,27	50	50	50
DTT	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$	154,24	1	1	1
KCl	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$	74,55	300	300	300
Imidazol	$\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$	68,08	20	20	200

2.4.2 Anzucht

Die Pin1-Proben zur Untersuchung im NMR wurden alle nach folgendem Schema hergestellt. Die Bakterienstämme mit dem kodierenden Plasmid lagen als Glycerin-gefrierkultur (-85°C) vor oder wurden bei Bedarf frisch transformiert. Mit diesen Stämmen wird über Nacht bei 37°C unter ständigem Schütteln bei 180 rpm in 30 ml LB-Medium ▶[Tab. 2.3](#) Vorkultur I angesetzt. Am nächsten Morgen wird mit Vorkultur I eine zweite Vorkultur in einem Liter LB-Medium angeimpft (OD_{600} 0,1) und bis auf OD_{600} 0,7–0,8 angezüchtet. Dieser Ansatz wird bei $5.000\times g$ und 20°C

in ein Liter Bechern 15-20 Minuten zentrifugiert⁶. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 1×PBS oder 0,9% NaCl-Lösung resuspendiert und unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Wiederum wird der Überstand verworfen, das Pellet in ¹⁵N-M9-Medium ▶Tab. 2.2 resuspendiert. Mit dieser Suspension werden vier Liter ¹⁵N-markiertes M9-Medium auf OD₆₀₀ 0,1 angeimpft. Hat die Kultur eine OD₆₀₀ von etwa 0,8 erreicht, wird sie mit 0,2 mM IPTG induziert und bei 30°C für weitere fünf Stunden bei 200 rpm inkubiert. Anschließend wird die Kultur bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 0,9% NaCl-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wird bei -20°C eingefroren.

2.4.3 Aufschluss und Reinigung

Der Aufschluss wurde im Microfluidizer⁷ oder mit Hilfe von Ultraschall⁸ (15 ml Fraktionen, 3×30 Sekunden, 30% Leistung) im Aufschlusspuffer ▶Tab. 2.5 durchgeführt. Dem Puffer wurden Proteasehemmer (EDTA-free Complete, Roche) und Lysozym zugesetzt. Der Aufschluss wurde anschließend für 45-60 Minuten bei 4°C und 30.000×g zentrifugiert⁹. Der Überstand wurde dekantiert und auf eine Affinitätssäule aufgetragen (für Proteine mit His-Tag: Ni-NTA-Säule¹⁰, für Pin_{WW} mit GST-Tag: GSH-Säule). Nach einem Waschschrift erfolgte die Elution unter Einwirkung von ca. 75 mM Imidazol im Elutionspuffer. Das Eluat wurde im Molekularsieb in der Zentrifuge¹¹ auf 1 ml eingengt und dann mit Gelfiltration¹² weiter gereinigt. Als Puffer wurde Phosphatpuffer (100 mM) mit 300 mM NaCl/KCl verwendet, pH 7,5-8. Über SDS-Gele wurden die proteinenthaltenden Fraktionen ermittelt. Die Fraktionen wurden vereint und mit einem Molekularsieb in der Zentrifuge konzentriert und anschließend umgepuffert.

2.4.4 Probenvorbereitung

Für die Messung im NMR wurde Kaliumphosphatpuffer mit pH 6,6 verwendet. In drei Schritten wurde das Protein für je 4-6 Stunden in Ein-Liter-Ansätzen NMR-Puffer dialysiert. Nach der Dialyse erfolgte die Konzentrationsbestimmung. Für die NMR-Messungen wurden 550 µl Probe (c=200-500 µM) mit 50 µl D₂O versetzt. Die

⁶Firma: Beckman, Modell: Avanti J-25 Centrifuge

⁷Firma Microfluidics, Modell: Microfluidizer M-110L

⁸Firma: Bandelin, Modell: HD2200

⁹Firma: Beckman, Modell: L8-80 ultracentrifuge

¹⁰Firma: Quiagen, Modell: Superflow 2,5×20 cm

¹¹Firma: Amicon, Modell: Centriprep MwCO: 5.000 kDa

¹²Firma: Sigma-Aldrich, Modell: Superdex75 16/10 oder 16/60

Messung erfolgte in Ampol NMR-Röhrchen¹³.

2.5 Titration im NMR-Röhrchen

Für die Messungen mit Peg und dem Peptid Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA wurde jeweils eine 200 μM Pin-Probe (Pin1_{fl}, Pin1_{WW} bzw. *short*Pin1) im NMR-Röhrchen vorgelegt. Die Pufferbedingungen können in ▶Tab. 2.4 eingesehen werden. Zusätzlich wurde eine Tablette *Complete Mini EDTA-free*¹⁴ Protease-Hemmer pro 20 ml Lösung zugegeben. Zur vorgelegten Probe wurden mit einer 5 μl Eppendorf-Pipette das benötigte Volumen für den zu messenden Titrationsschritt im oberen Bereich des Röhrchens auf die Innenwand pipettiert. Nach verschließen des Röhrchens wurde dieses mehrmals um 180° gedreht, bis die Pin-Probe und die zutitrierte Lösung gut durchmischt waren.

Für die Peg-Messungen wurden den 200 μM Pin-Proben wurde in sechs Titrationsschritten Peg400 zutitriert. Die Endkonzentrationen nach jedem Titrationsschritt sind in ▶Tab. 2.6 zusammengefasst, die ebenfalls die Konzentrationen für die Titrationsschritte mit dem Peptid enthält.

Tab. 2.6: Titrationsschritte für die Messung mit Peg400 und dem Peptid Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA

Titrationsschritt	c(Peg) [mM]	c(Peg) [%] (m:m)	c(Peptid) [μM]
1	0	0	0
2	5,5	0,2	80
3	16,5	0,6	200
4	27,5	1,0	400
5	47,5	1,7	800
6	82,5	3,0	1400
7	–	–	2320

Nach jedem Schritt wurde ein ^{15}N -HSQC-Spektrum aufgenommen. Die Spektrenparameter können ▶Tab. 6.5 im Anhang entommen werden.

¹³Firma: Ampol, Modell: AP5-800-7

¹⁴Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

3 Ergebnisse

Die zwei von Pin1 veröffentlichten Strukturen 1PIN ([Ranganathan et al., 1997](#)) und 1NMV ([Bayer et al., 2003](#)) zeigen das Protein in zwei verschiedenen Konformationen, geschlossen bzw. offen. Die offene Struktur wurde mit NMR aufgeklärt, die geschlossene mit RSA. Es stellt sich die Frage, wie sich nachweisen lässt, ob beide Strukturen in vitro nebeneinander existieren und wenn, ob die geschlossene Struktur auch mit NMR detektierbar ist. Für Aminosäuren, deren chemische Umgebung in den jeweiligen Konformationen unterschiedlich ist, kann es dann eventuell Aufspaltungen für die Resonanzen im zweidimensionalen (2D) ^{15}N -HSQC-Spektrum geben. Im Rahmen der Untersuchungen an Pin1 wurden NMR-Spektren bei verschiedenen Temperaturen aufgenommen, und Messreihen mit verschiedenen Konzentrationen von Liganden, um deren Einfluss auf die Struktur des Proteins zu untersuchen. Als Liganden wurden das Peptid „Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA“ sowie Polyethylenglykol mit einem Molekulargewicht von 400 Da (Peg400) verwendet.

3.1 Einfluss der Temperatur auf die Struktur von Pin1

Molekülbewegung und daraus folgend die Geschwindigkeit von Reaktionen und Interaktionen sind nach Arrhenius von der Temperatur abhängig. Um Reaktionen oder Wechselwirkungen zu messen, die bei Raumtemperatur sehr schnell ablaufen und nicht mehr messbar sind, kann diese Abhängigkeit von Vorteil sein. Ein Abkühlen der Reaktionsumgebung kann die Reaktionsgeschwindigkeit soweit herabsetzen, dass sie detektierbar werden. Zur Untersuchung des Temperatureinflusses auf die Struktur und Dynamik der Domänen von Pin1 und einer möglichen Domäneninteraktion wurden verschiedene Klonvarianten untersucht (Pin1_{*fl*}, Pin1_{*WW*}, *short*Pin1). Die ^{15}N -HSQC-Spektren wurden in einem Temperaturbereich zwischen 3 und 30°C mit einem Intervall $\Delta T = 3^\circ\text{C}$ aufgenommen.

3.1.1 Ergebnisse der Temperaturmessung von Pin1

Die in diesem Teil präsentierten Spektren sind ^{15}N -HSQC-Spektren. Ihre Signale zeigen H-N-Kopplungen zwischen den Amidprotonen der Aminosäuren des Proteinrückgrats und auch der Seitenketten einiger Aminosäuren (Trp, Asn, Gln) an. Die Signale aller 2D-Spektren wurden mit der Software Sparky manuell nach Vorlage ([Bayer](#)

et al., 2003) zugeordnet und anschließend überlagert und ausgewertet. ▶Abb. 3.1 zeigt der besseren Übersicht wegen nur die Spektren für die Temperaturen 3, 6, 14, 21 und 30°C. Die einzelnen Spektren sind farblich unterschiedlich gehalten, wobei das Farbspektrum von blau für die niedrigste Temperatur (3°C) bis rot bei der höchsten Temperatur (30°C) reicht.

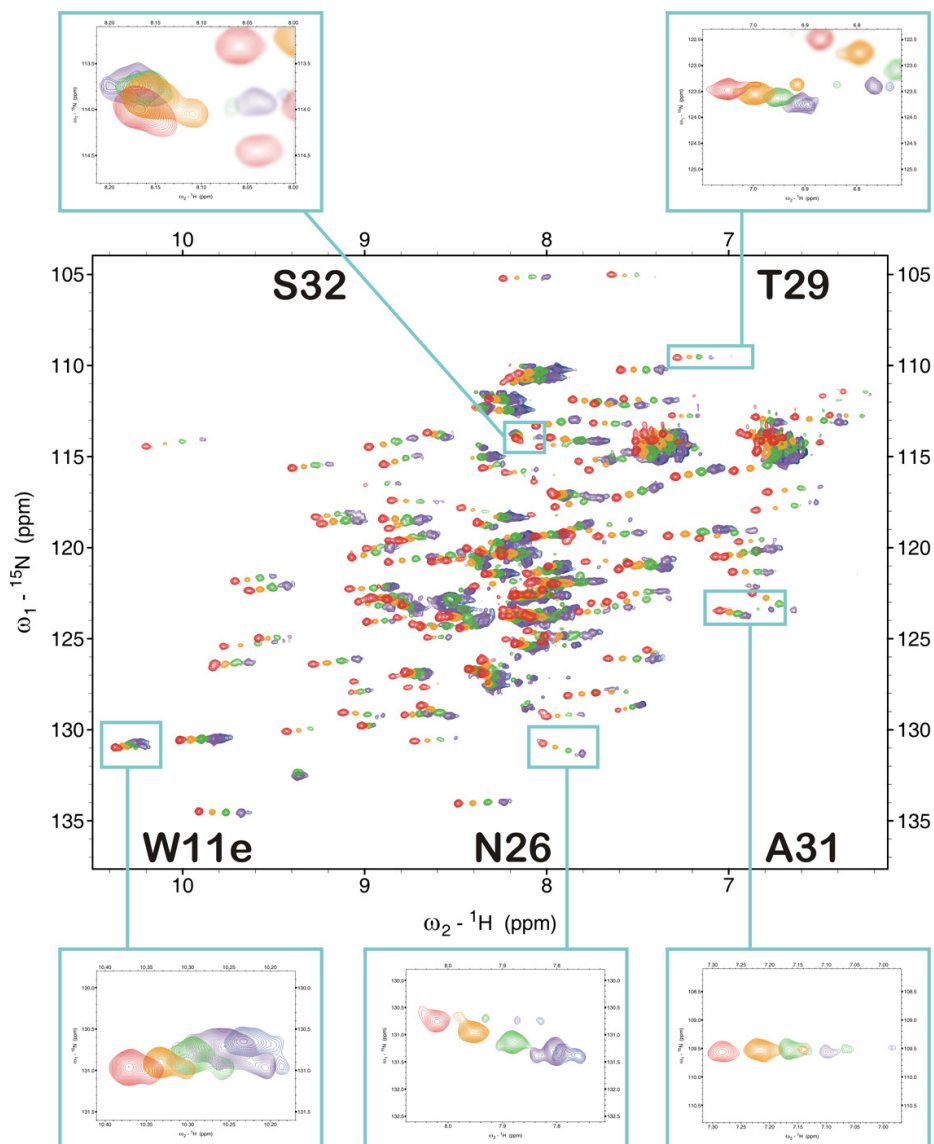


Abb. 3.1: Überlagerung der ^{15}N -HSQC-Spektren im Temperaturbereich von 3-30°C. blau - 3°C, rot - 30°C

Bei der Überlagerung fällt auf, dass einige Signale, abhängig von der Temperatur ihre Position ändern (shiften) und/oder in zwei Peaks aufspalten ▶Abb. 3.1, die im folgenden mit A und B bezeichnet werden. Aufspaltende und sich verschiebende Signale sind für die Auswertung von besonderem Interesse, da sie eine Veränderung der

chemischen Umgebung des Stickstoffs und/oder des Protons der betreffenden Aminosäure anzeigen. Ein Aufspalten kann für die Peaks der Aminosäuren T29, A31, S32, W11e und N26 beobachtet werden. Diese Aminosäuren liegen in der Kristallstruktur im Bindungsinterface beider Domänen (Ranganathan et al., 1997), ►Abb. 1.7(c). Eine Übersicht gibt ►Abb. 3.2 in der Auszüge aus den Spektren gezeigt werden, die bei verschiedenen Temperaturen aufgenommen wurden.

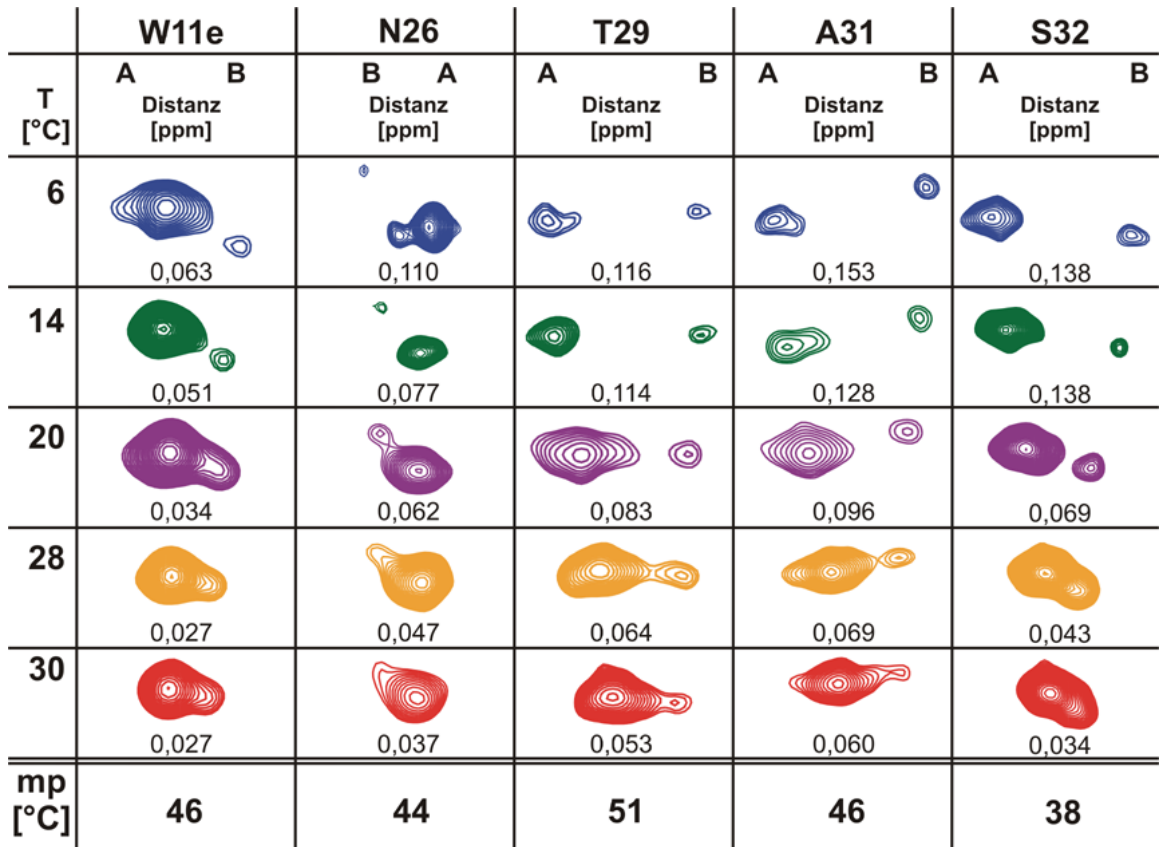


Abb. 3.2: Zusammenfassung der Temperaturmessreihe von Pin1_{fl}. Aufspaltungen der Peaks bei verschiedenen Temperaturen. „Distanz“ gibt den Abstand zwischen beiden Signalen in ppm wider. „mp“ beschreibt den extrapolierten Koaleszenzpunkt beider Peaks.

Die Positionen der Signale einer Aminosäure bei verschiedenen Temperaturen sind für die Abbildung verschoben worden und entsprechen nicht den Positionen in den übereinandergelagerten Originalspektren. Ihre Positionen in Bezug auf die Originalspektren sind in der Art verschoben, dass beide Signale mit steigender Temperatur V-förmig aufeinander zulaufen. Diese Art der Darstellung wurde gewählt, weil sie sehr gut erkennen lässt, dass der Abstand zwischen A und B (Δ_{AB}) mit steigender Temperatur abnimmt. Die genauen Werte für alle Δ_{AB} sind ebenfalls der Grafik zu entnehmen. So beträgt Δ_{AB} bei 6°C im Schnitt noch über 0,1 ppm. Bis zu einer

Temperatur von 30°C schmilzt der Abstand auf unter 0,06 ppm zusammen und die Einzelsignale von A und B sind nicht mehr getrennt voneinander detektierbar, weil sie ineinanderlaufen. Über Extrapolation kann die Temperatur berechnet werden, bei der die Maxima von A und B sich völlig überlagern. Bedingung für diese Berechnung ist, dass die Signale auch bei höheren Temperaturen weiterhin in der Art linear aufeinander zulaufen, wie im Temperaturbereich zwischen 3 und 30°C. Für die Berechnung wurde die Excel-Funktion „Trendlinie“ verwendet. Die Schnittpunkte von Δ_{AB} mit der x-Achse ▶Abb. 3.3 können dann als „c“ aus der angegebenen Geradengleichung der Form $y = m \times x + c$ entnommen werden.

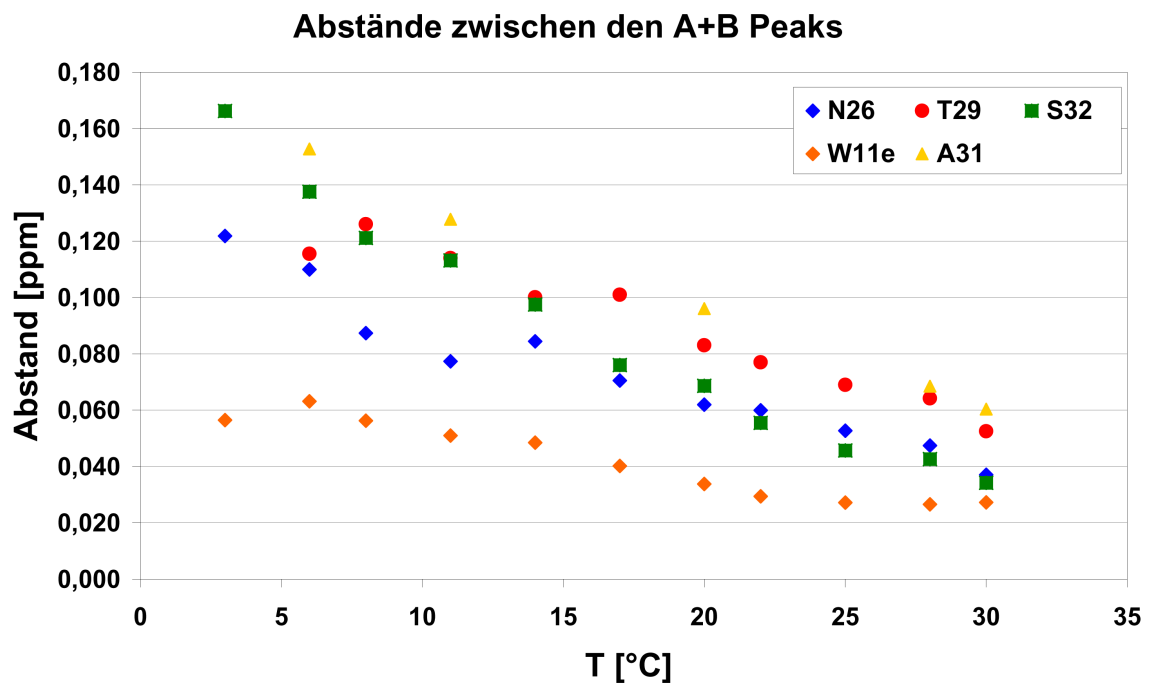


Abb. 3.3: Distanz zwischen den A- & B-Peaks für den Temperaturbereich von 3-30°C.

Tab. 3.1: Berechnete Koaleszenzpunkte der Peaks A und B über die Schnittpunkte mit der X-Achse ▶Abb. 3.3.

	N26	T29	A31	S32	W11ε
berechneter Schnittpunkt [°C]	44	51	46	38	46
Standardabweichung [°C]	11	11	10	10	11

Die Ergebnisse der Extrapolation finden sich in ▶Tab. 3.1 und sind ebenfalls in der Übersicht der aufspaltenden Peaks ▶Abb. 3.2 als Koaleszenzpunkt angegeben. Die

berechneten Werte liegen zwischen 38 (S32) und 51°C (T29) ($\pm 10 - 11^\circ\text{C}$ Standardabweichung). Eine Überprüfung der Werte über NMR-Spektren wird nicht möglich sein, da sich die Signale schon bei 30°C soweit überlagern, dass sie sich kaum voneinander trennen lassen, und da bei Temperaturen über 40°C zu erwarten ist, dass die Proteinprobe ausfällt.

Neben den Verschiebungen im 2D-Spektrum können auch die Verhältnisse der Peakhöhen von A zu B Aufschluss über den Grund der Aufspaltung der Signale geben. Die Berechnungen können auch auf Grundlage der Signalvolumina durchgeführt werden. Da diese sich mit steigender Temperatur zunehmend überlagern, können sie nicht mehr so gut den einzelnen Signalen zugeordnet werden. Daher werden die Signalthöhen für die Auswertung herangezogen.

Die Ergebnisse geben den Anteil des Signals A bzw. B an der Summe der Signalthöhen A+B wider und werden in Prozent angegeben. ▶Abb. 3.4 stellt das Verhältnis der Signalthöhen von A und B in Abhängigkeit von der Temperatur dar. Das Verhältnis ändert sich mit steigender Temperatur von $\frac{60\%}{40\%}$ bei 3°C auf bis zu $\frac{80\%}{20\%}$ bei 30°C. Die temperaturabhängige Veränderung im Verhältnis der Populationen lässt auf ein dynamisches Gleichgewicht zwischen beiden Zuständen schließen.

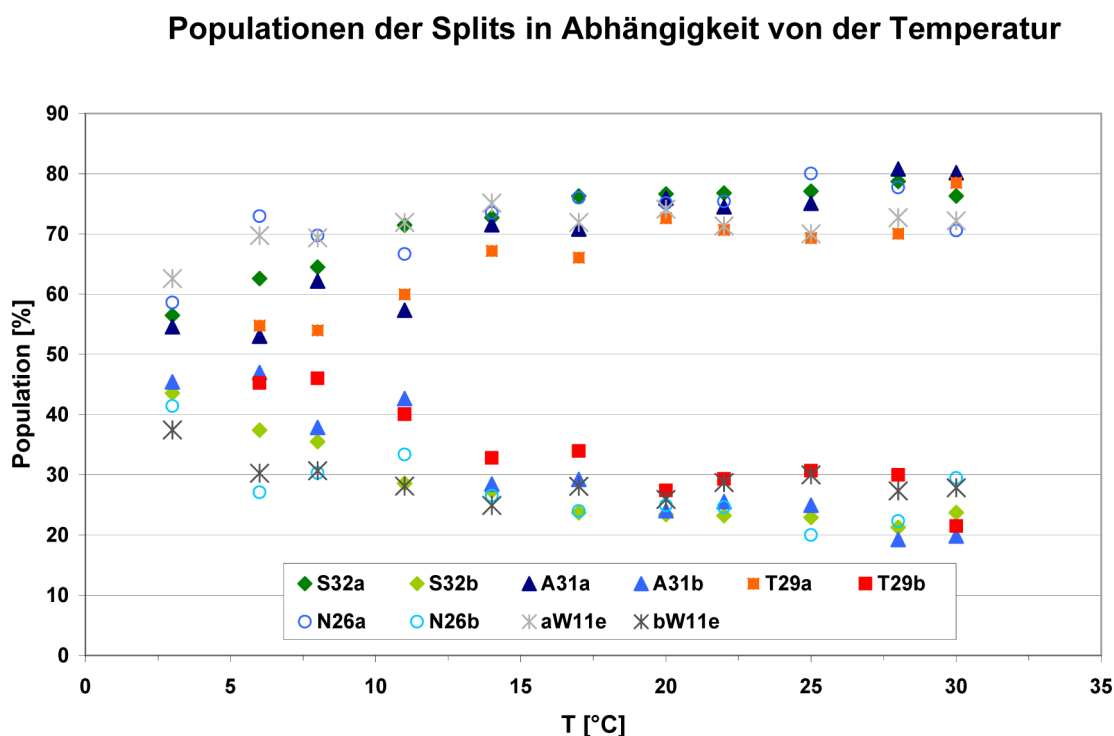


Abb. 3.4: Population der Anteile A & B für den Temperaturbereich von 3-30°C. Die temperaturabhängige Veränderung im Verhältnis der Populationen lässt auf ein dynamisches Gleichgewicht zwischen beiden Zuständen schließen.

Bayer postuliert (Bayer et al., 2003), dass die stärker populierte Form in Lösung bei 27°C, die offene Form ist. Falls die Peakvolumina den Populationen entsprechen, sollte daher der Peak mit höherem Volumen der offenen Form entsprechen. In dieser Arbeit wird dieser Peak mit „A“ bezeichnet, der schwächere mit „B“. Diese Ergebnisse wurden mit Messungen bei 27°C erzielt und sollten daher auch auf die Ergebnisse meiner Messreihen übertragbar sein. Denn sowohl bei 27°C wie auch bei den anderen Temperaturen ist immer derselbe Peak stärker populierte. Dieser wird in dieser Arbeit mit A bezeichnet. Über das Verhältnis von A zu B lässt sich mit der Gibbs-Helmholtz-Gleichung die Freie Enthalpie zwischen beiden Zuständen berechnen ▶Gl. 3.1.

$$\begin{aligned}\Delta G^0 &= -R \times T \times \ln(K) ; K = \frac{A}{B} \\ \Delta G^0 &= -R \times T \times \ln\left(\frac{A}{B}\right)\end{aligned}\tag{3.1}$$

Gibbs-Helmholtz-Gleichung für die Berechnung der Freien Energie zwischen den Populationen A und B: k=Reaktionsgeschwindigkeitskonstante, R=allg. Gaskonstante ($8,314 \frac{J}{mol \times K}$), T=Temperatur [K], A=Population von Peak A (Peakhöhe), B=Population von Peak B

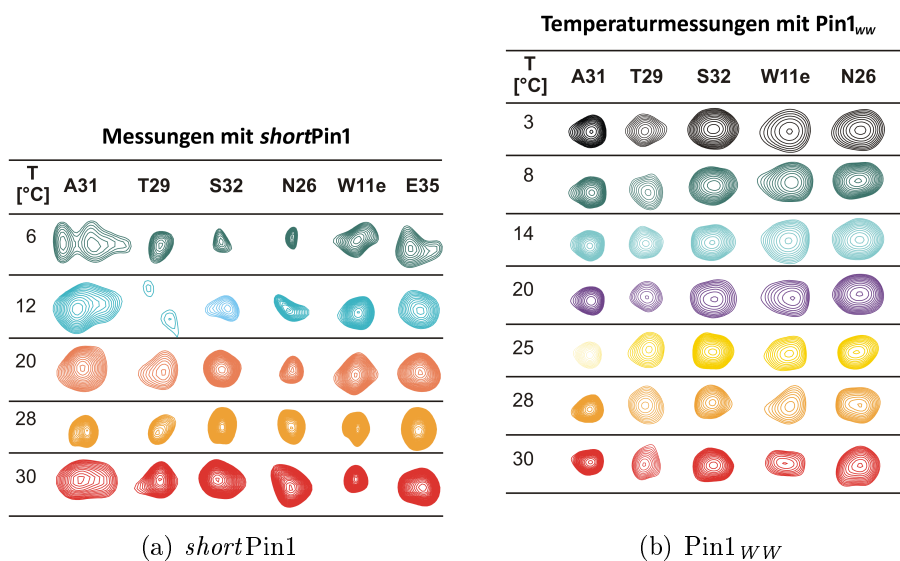
Die Ergebnisse der Berechnungen für die Messreihen zwischen 3 und 30°C sind ▶Tab. 3.2 zu entnehmen. In der letzten Spalte sind jeweils die Mittelwerte über alle Peaks bei einer Temperatur aufgeführt. Die Werte zeigen, dass für alle aufgeführten Aminosäuren Zunahmen der Freien Energie bei höheren Temperaturen zu erkennen sind.

3.1.2 Einfluss der Temperatur auf Pin1-Konstrukte

Um die Ursache für das Aufspalten weiter eingrenzen zu können, und zu klären, ob diese durch Veränderungen innerhalb der WW-Domäne, durch Wechselwirkungen zwischen beiden Domänen oder durch die PPIase-Domäne induzierte Veränderungen in der WW-Domäne zustande kommen, wurden Vergleichsspektren mit den Proteinen Pin1_{WW} und shortPin1 ▶Kap. 2.3 aufgesetzt. Wie ▶Abb. 3.5(a) und ▶Abb. 3.5(b) zu entnehmen ist, zeigen sich für diese Pin-Konstrukte keine Aufspaltungen, die sich temperaturabhängig verändern. Für Peak A31 und T29 fallen die Signale bei 6°C bzw. 12°C auf, da sie nur bei einer Temperatur aufspalten.

Tab. 3.2: Freie Enthalpie zwischen den beiden Zuständen von Pin1 in Abhängigkeit von der Temperatur.

T [°C]	T [K]	Freie Enthalpie [J/mol]					
		W11ε	N26	T29	A31	S32	Mittelwert
3	276,15	-1180	-798		-422	-596	-749
6	279,15	-1937	-2299	-444	-280	-1194	-1231
8	281,15	-1907	-1950	-374	-1161	-1394	-1357
11	284,15	-2220	-1636	-953	-699	-2167	-1535
14	287,15	-2637	-2433	-1711	-2200	-2337	-2264
17	290,15	-2267	-2783	-1607	-2136	-2821	-2323
20	293,15	-2564	-2692	-2376	-2803	-2895	-2666
22	295,15	-2235	-2746	-2158	-2628	-2934	-2540
25	298,15	-2102	-3439	-2021	-2732	-3009	-2661
28	301,15	-2450	-3124	-2125	-3592	-3275	-2913
30	303,15	-2403	-2202	-3265	-3520	-2943	-2867

**Abb. 3.5:** Überlagerung der ^{15}N -HSQC-Spektren im Temperaturbereich von 3-30°C. blau - 3°C, rot - 30°C

Die Messungen mit Pin1_{fl} zeigen aufspaltende Peaks, die Vergleichsmessungen der Konstrukte Pin_{ww} und short-Pin nicht (mit Ausnahme der angesprochenen Auffälligkeiten für A31 und T29). Die Ursache des Aufspaltens der Signale liegt demnach nicht allein bei Strukturveränderungen innerhalb der WW-Domäne. Die Anwesenheit der PPIase-Domäne ist Voraussetzung für das Auftreten des Phänomens. Aufgrund dieses Ergebnisses kann angenommen werden, dass es sich entweder um die Aus-

wirkung einer direkten Domäneninteraktion handelt, oder die PPIase-Domäne auf anderem Wege, z.B. über den Linker, Strukturveränderungen in der WW-Domäne induziert.

Zur genaueren Betrachtung der Domäneninteraktion wurde die Pin-Variante *shortPin1* kloniert, in der vier Aminosäuren aus der Linkerregion entfernt wurden. Durch das kürzere Bindeglied zwischen beiden Domänen wird das Zusammenspiel der zwei Domänen soweit eingeschränkt, dass keine Auswirkungen auf die WW-Domäne im ^{15}N -HSQC mehr zu detektieren sind und sich keine Aufspaltungen zeigen. In diesen Experimenten wird die Rolle des flexiblen Linkers als Vermittler zwischen beiden Domänen deutlich. Ein verkürzter Linker führt dazu, dass eine Interaktion/Umlagerung von WW- und PPIase-Domäne zueinander sterisch behindert wird. Die zweite Möglichkeit wäre, dass eine durch die PPIase-Domäne induzierte Veränderung über ein Verkürzen des Linkers gestört bzw. verhindert wird.

Das Verhältnis der Populationen ist temperaturabhängig und ändert sich leicht. Mit steigender Temperatur nimmt auch das Verhältnis zwischen beiden Populationen zu. Dieser Effekt ist reversibel. Wenn die Temperatur wieder gesenkt wird, werden die ursprünglichen Populationen wieder erreicht.

3.2 Messung mit Polyethylenglykol

Die temperaturabhängigen Aufspaltungen einiger Peaks im Bindungsinterface der Domänen führen zu der Annahme, dass Pin1 in Lösung in zwei Zuständen vorliegt und die aufspaltenden Resonanzen genau diese zwei Zustände beschreiben. Als mögliche Ursache wird eine Interaktion zwischen WW- und PPIase-Domäne herangezogen. In der Literatur (Bayer et al., 2003; Jacobs et al., 2003) wird das Modell eines dynamischen Gleichgewichts zwischen beiden bekannten Konformationen beschrieben und es wird postuliert, dass die offenen Konformation stärker populiert ist. Wenn die aufspaltenden Resonanzen tatsächlich die beiden bekannten Konformationen beschreiben, und diese in einem dynamischen Gleichgewicht stehen, könnte sich dieses mit der Hilfe geeigneter Liganden beeinflussen lassen.

Für die Aufklärung der Kristallstruktur wurde Polyethylenglykol mit einem Molekulargewicht (M_w) von 400 g/Mol (Peg400) als Koagens für die Kristallisation verwendet. In der publizierten Struktur sind zwei Bindungsstellen für das Polymer dargestellt. Da eine dieser Bindungsstellen zwischen den beiden Domänen liegt ▶Abb. 1.6(a), soll in dieser Messreihe überprüft werden, ob sich mit diesem Liganden das Gleichgewicht auf die Seite der geschlossenen Konformation verschieben lässt. Dies sollte sich dann in einer Veränderung der Populationen der Peaks widerspiegeln.

Weiterhin deuten die unterschiedlich besetzten Populationen der detektierten Zustände in den Temperaturmessungen auf unterschiedliche Energieniveaus der beiden Zustände hin, die sich in ihre ΔG^0 (Freie Enthalpie) unterscheiden. Diese sollte sich durch geeignete Liganden, die die propagierte Domäneninteraktion verstärken, beeinflussen lassen. Ein Einfluss des Liganden auf die ΔG^0 ließe sich dann aus dem Besetzungsverhältnis der Populationen ableiten.

Ob und inwieweit Peg400 einen Einfluss auf die Struktur von Pin1 und die zwei Populationen hat sowie mit welchem K_D es bindet, wurde mit NMR untersucht. Die Messungen mit Peg400 wurden alle bei einer Temperatur von 28°C durchgeführt. Einer 200 μ M Probe wurde in mehreren Schritten Peg400 bis zu einer Konzentration von 3% (m:m, $\hat{=}$ 82,5 mM) zutitriert, von den einzelnen Titrationsschritten wurden ^{15}N -HSQC-Spektren aufgenommen ▶Tab. 3.3. Auch bei dieser Messreihe wurden zum Vergleich Spektren der Pin-Varianten Pin1_{WW} und *short*Pin1 aufgenommen.

Tab. 3.3: Titration mit Peg400

Titrationsschritt	c(Peg) [mM]	c(Peg) [%]
1	0	0
2	5,5	0,2
3	16,5	0,6
4	27,5	1,0
5	47,5	1,7
6	82,5	3,0

3.2.1 Ergebnisse der Messung mit Peg400

3.2.1.1 Einfluss von Peg400 auf die chemische Verschiebung von ^{15}N -HSQC-Resonanzen

Wird der Proteinprobe Peg400 (0-3%)¹ zugegeben, verschieben sich einige Signale im ^{15}N -HSQC-Spektrum ▶Abb. 3.6. Die Distanzen der Verschiebungen für die einzelnen Titrationsschritte werden in ▶Tab. 3.4 aufgeführt. Die maximale Verschiebung wird bei 3% Peg erreicht (letzte Spalte).

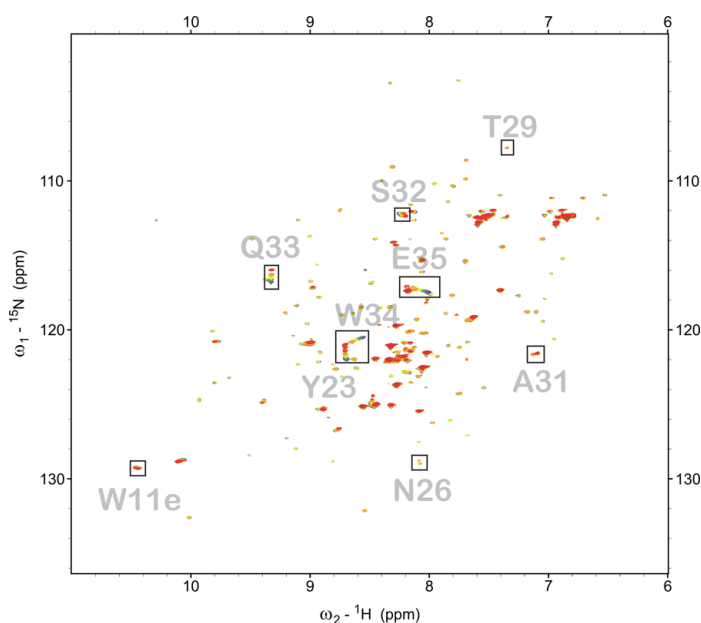


Abb. 3.6: Peaks aus den HSQC-Titrationsspektren mit Peg400. Signale die sich unter Einfluss von Peg400 verschieben und/oder aufspalten sind umrahmt.

Die Signale von Y23, Q33, W34 und E35 zeigen stark ausgeprägte Shifts ($<0,09$ – $0,19$ ppm). Die Peaks E35 und Y23 spalten zusätzlich auf, letztgenannter im Vergleich sehr schwach. Die aufspaltenden Signale von W11e, N26, T29, A31 und S32 verschieben sich kaum ($\leq 0,032$ ppm). Die Aufspaltungen werden in ▶Kap. 3.2.1.2 separat behandelt.

Über die Verschiebungen im Spektrum lassen sich K_D -Werte von Peg für jede Aminosäure errechnen ▶Gl. 2.8. Vier Ergebnisse für Fits mit Matlab sind im Anhang beispielhaft beigelegt ▶Abb. 6.4. Allgemein sagt der K_D -Wert etwas darüber aus, wie gut ein Ligand bindet. Je stärker die Interaktion, desto kleiner der K_D -Wert.

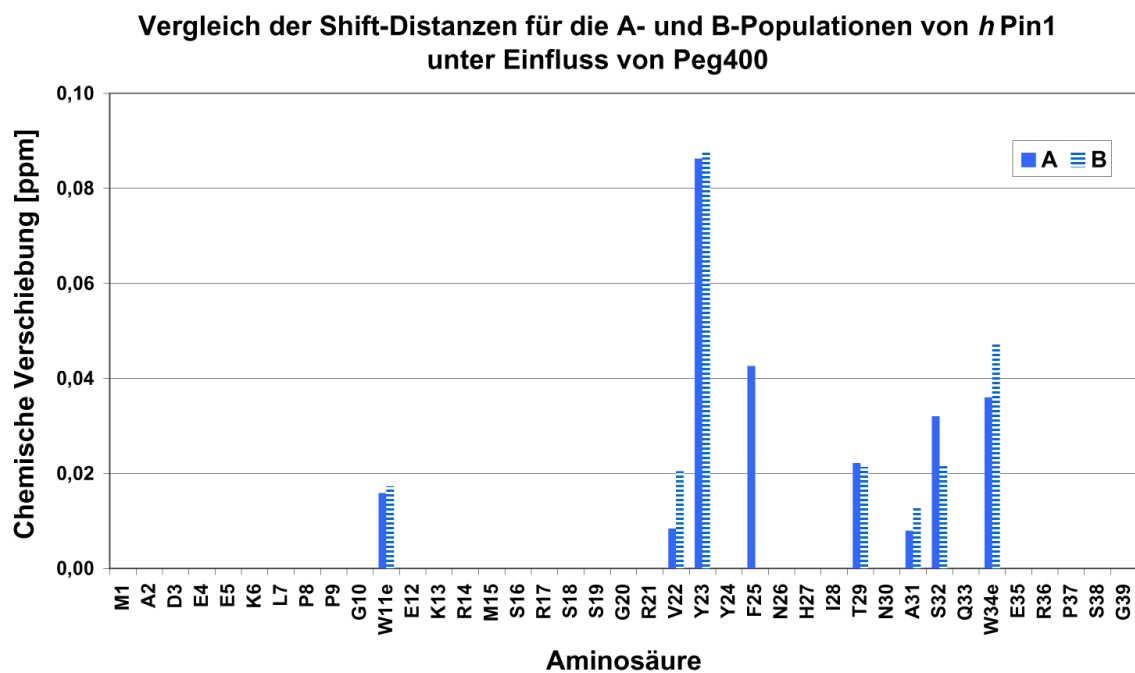
Wichtig an dieser Stelle ist, dass es sich bei den über die Verschiebungen im Spektrum berechneten K_D -Werten um mikroskopische und nicht um makroskopische Werte handelt, die eine Aussage über die Intensität der Wechselwirkung zwischen Ligand und

¹eine Umrechnung in mM findet sich in ▶Tab. 3.3

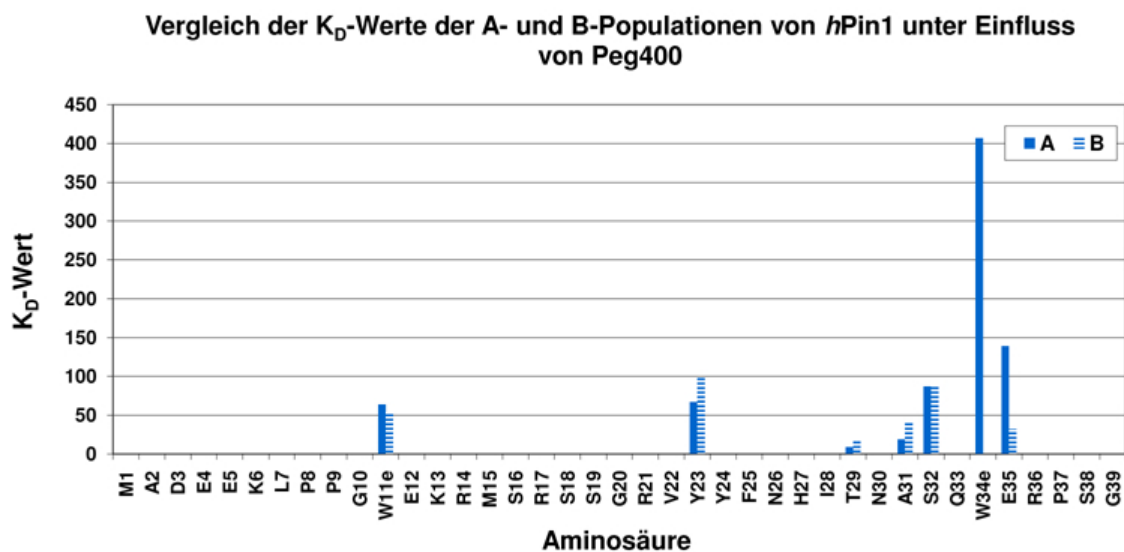
Tab. 3.4: Distanzen der Verschiebungen in Abhängigkeit der Konzentration von Peg400 bezogen auf die Position des Signals im Spektrum ohne Einfluss durch Peg400.

Aminosäure	Δ 0,2% [ppm]	Δ 0,6% [ppm]	Δ 1% [ppm]	Δ 1,7% [ppm]	Δ 3% [ppm]
W11	0,0033	0,0042	0,0040	0,0070	0,0081
aW11 ϵ	0,0054	0,0054	0,0070	0,0115	0,0158
bW11 ϵ	0,0051	0,0065	0,0078	0,0147	0,0173
Y23a	0,0112	0,0315	0,0464	0,0605	0,0862
Y23b	0,0117	0,0269	0,0429	0,0596	0,0876
aT29	0,0050	0,0028	0,0046	0,0150	0,0222
bT29	0,0111	0,0090	0,0118	0,0121	0,0214
aA31	0,0062	0,0090	0,0113	0,0130	0,0079
bA31	0,0050	0,0060	0,0050	0,0090	0,0130
aS32	0,0021	0,0080	0,0181	0,0260	0,0320
bS32	0,0011	0,0081	0,0110	0,0143	0,0216
Q33	0,0125	0,0347	0,0597	0,0817	0,1317
W34	0,0178	0,0473	0,0761	0,1098	0,1791
E35a	0,0242	0,0516	0,0814	0,1149	0,1801
E35b	0,0443	0,0906	0,1199	0,1469	0,1948

gesamtem Enzym zulassen. Darauf wird in der Diskussion näher eingegangen ▶[Kap. 4](#). Nach Auslesen der Signalintensitäten wurde für die Berechnung der Verschiebungen der Peaks bei den verschiedenen Peg-Konzentrationen der Unterschied in den Spektralen Weiten der ^1H - und ^{15}N -Achsen herausgerechnet ▶[Kap. 2.2](#). Anschließend wurde anhand der Peakpositionen in den übereinandergelagerten Spektren die Distanz in Bezug auf die Position der Peaks im Spektrum ohne Peg ermittelt. Aus diesen Werten wurden dann in Abhängigkeit von der Peg-Konzentration die K_D -Werte gefittet. In ▶[Abb. 3.7](#) und ▶[Tab. 3.5](#) werden sowohl die Distanzen der Verschiebungen (Shifts) sowie die Ergebnisse aller Fits aufspaltender Resonanzen aufgeführt.



(a) K_D -Werte für Peg400 an Pin1.



(b) Vergleich der K_D -Werte beider Populationen.

Abb. 3.7: Gefittete K_D -Werte.

Tab. 3.5: Auszug der gefitteten K_D -Werte von Peg400 an Pin1. Die Abkürzungen stehen für AS=Aminosäure, K_D =Dissoziationskonstante, ΔF_{max} =Signalintensität, Stabw=Standardabweichung

AS	K_D [mM]	ΔF_{max}	Stabw
W11	23	1,22	0,11
aW11 ε	64	1,74	0,10
bW11 ε	54	1,67	0,09
E12	55	1,57	0,07
aY23	67	1,79	0,02
bY23	99	2,18	0,02
Y24	48	1,46	0,10
aA31	19	1,14	0,07
bA31	42	1,4	0,13
aS32	87	2,13	0,06
bS32	88	2,03	0,05
W34	215	3,57	0,02
aW34 ε	407	5,72	7,31
aE35	139	2,65	0,02
bE35	32	1,35	0,03
R36	70	1,91	0,07
Max:	215	2,65	0,13
Min:	19	1,14	0,02
Ø:	94	1,73	0,07
Stabw:	32	0,42	0,04

Die Ergebnisse aller Fits (inklusive nicht aufspaltender Resonanzen) finden sich im Anhang in ▶Tab. 6.2. Die berechneten Dissoziationskonstanten liegen im Bereich von 19–139 mM. Für fünf Aminosäuren konnten die K_D -Werte für die Populationen A und B berechnet werden. Für Y23 und A31 liegen die Werte für A niedriger, bei W11 ε und E35 verhält es sich umgekehrt. Die Differenzen zwischen A- und B-Wert (ΔK_D) betragen für Y23 32 mM, für A31 23 mM, für W11 ε 10 mM und für E35 107 mM. Für S32 ist kaum ein Unterschied zu erkennen, die Werte liegen um 1 mM auseinander.

3.2.1.2 Peg-induzierte Aufspaltungen von ^{15}N -HSQC-Resonanzen

Aus den übereinandergelagerten 2D- ^{15}N -HSQC-Spektren wurden aufspaltende Peaks extrahiert und in ▶Abb. 3.8 tabellarisch dargestellt. Im Anhang wird zusätzlich das Spektrum bei 20°C mit allen aufspaltenden Peaks als Gesamtübersicht gezeigt ▶Abb. 6.3.

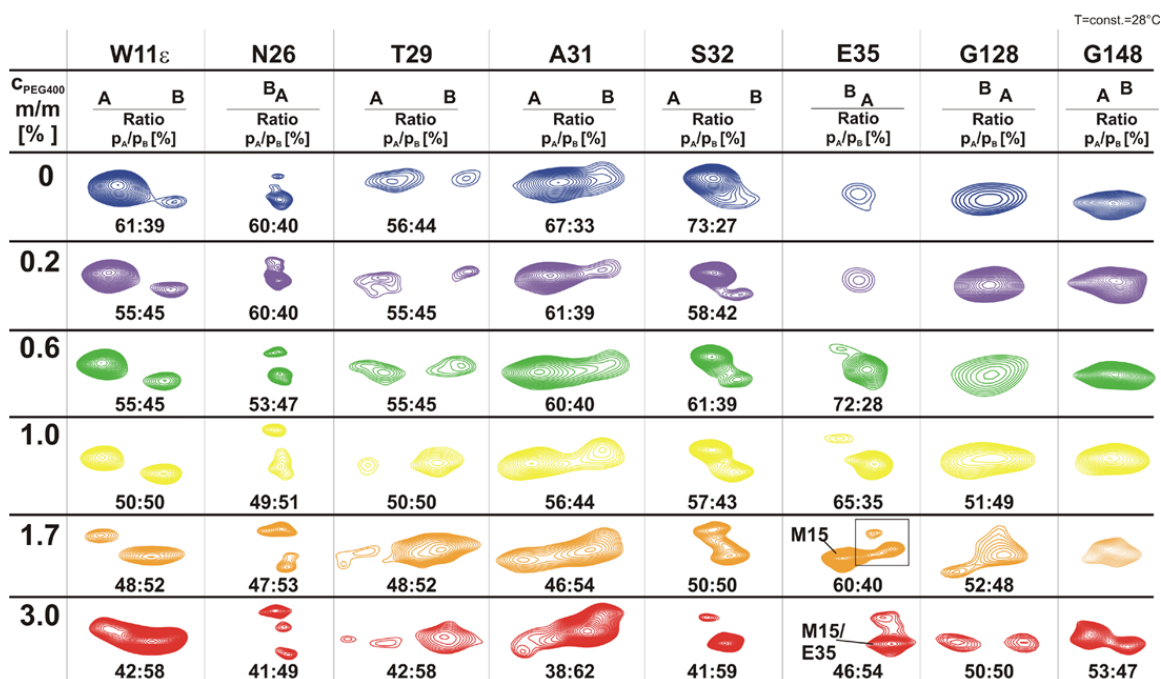


Abb. 3.8: Peaks aus den HSQC-Titrationsspektren mit PEG400. Die Tabelle gibt die Aufspaltung der Peaks und das Verhältnis der Populationen in Abhängigkeit der Konzentration von Peg400 wider. Die Verhältnisse sind jeweils unter den Peaks aufgeführt.

Hauptsächlich Peaks von Aminosäuren, die in der WW-Domäne lokalisiert sind, weisen unter Einfluss des hydrophoben Liganden Peg zwei Zustände auf. In der PPIase-Domäne spaltet der Peak der Aminosäuren G128 zwar auf, jedoch erst bei einer Konzentration von 1% Peg, der Peak G148 bei 3%. Die Aminosäuren der WW-Domäne, deren Signale aufspalten, sind in der Projektion auf die Kristallstruktur ►Abb. 3.9 dargestellt.

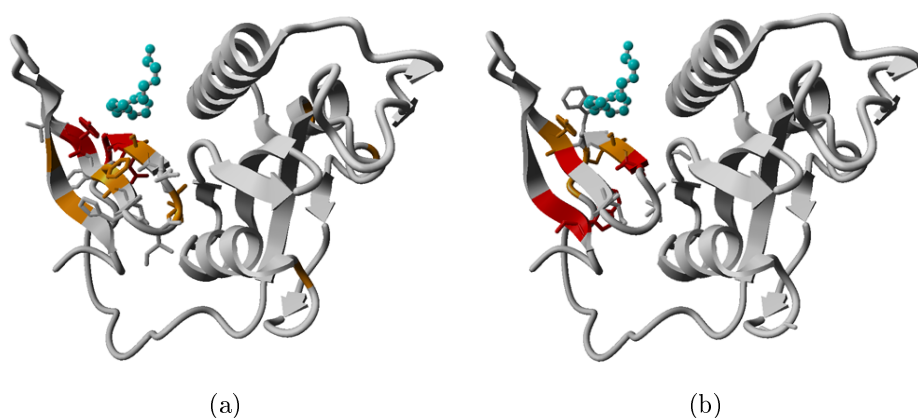


Abb. 3.9: Projektion der Chemischen Verschiebung (a) und der K_D -Werte (b) auf die Kristallstruktur 1PIN mit eingelagertem Peg400-Molekül (cyan). a) Die Resonanzen sind nach der Distanz ihrer Chemischen Verschiebung eingefärbt: orange – 0,02–0,05 ppm, rot – >0,05 ppm, grau – keine Verschiebung bzw. keine Ergebnisse. b) Einfärbung nach den K_D -Werten: orange – >60 mM, rot – <60 mM, grau – keine Fitergebnisse verfügbar. Die in Anwesenheit von Peg aufspaltenden Aminosäuren W11 ϵ , N26, T29, A31, S32 und E35 sind als *Sticks* hervorgehoben.

Auch auf die Intensitäten der aufspaltenden Peaks und das Verhältnis der Populationen hat Peg400 Einfluss ▶Tab. 3.6. Die Intensitäten der Peaks in der WW-Domäne kehren sich für vier der sechs Aminosäuren von $\frac{60\%}{40\%}$ bzw. $\frac{70\%}{30\%}$ auf $\frac{40\%}{60\%}$ um, im Falle der Aminosäuren E35 und N26 stellt sich ein Gleichgewicht von $\frac{50\%}{50\%}$ ein.

Tab. 3.6: Aufspaltende Peaks

	0% Peg	3% Peg
Aminosäure	Populationsverhältnis	
WW-Domäne		
W11ε	60:40	40:60
N26	60:40	50:50
T29	60:40	40:60
A31	70:30	40:60
S32	70:30	40:60
E35	70:30	50:50
∅ (gerundet):	60:40	40:60
PPIase-Domäne		
G128	–	50:50

Das schwache Signal des B-Peaks von Y23 macht an dieser Stelle keine Auswertung für diesen Peak möglich. ►Abb. 3.10 zeigt die Projektionen der Resonanzen von T29 und A31 aus den ^{15}N -HSQC-Spektren, die unter Einfluss verschiedener Peg-Konzentrationen aufgenommen wurden. Die Umkehr der Populationen lässt sich anhand dieser Darstellung gut nachvollziehen.

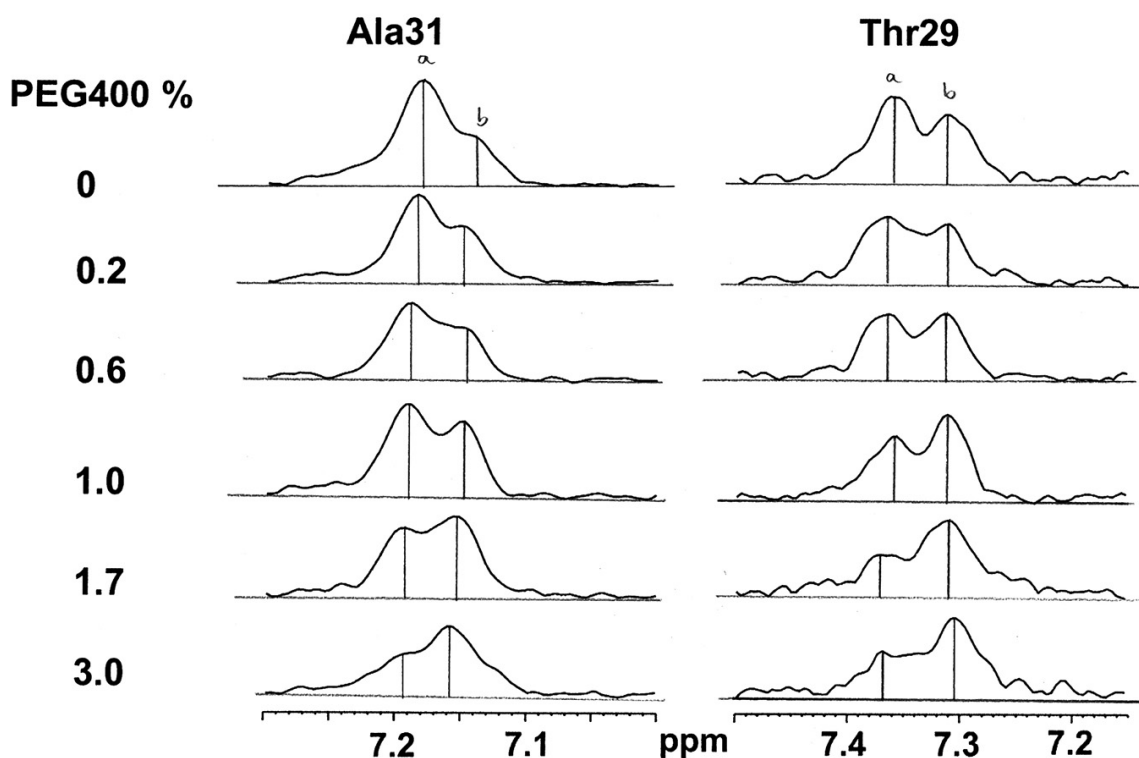


Abb. 3.10: Verlauf der Populationsumkehr in Abhängigkeit von der Peg-Konzentration am Beispiel von A31 und T29. Dargestellt sind die Projektionen der Peaks aus dem ^{15}N -HSQC-Spektrum.

Der Verlauf der Populationsumkehr für die Peaks der WW-Domäne könnte weitere Hinweise auf deren Ursache geben. Für die Auswertung wurden A- und B-Peak der aufspaltenden Signale der einzelnen Aminosäuren in Liniendiagrammen gegeneinander aufgetragen. ►Abb. 3.11 zeigt dies anhand der Populationen von A31 und S32. Für beide A-Peaks nehmen die Populationen in Abhängigkeit der Peg400-Konzentration ab wohingegen die B-Populationen zunehmen. Der Verlauf der Datenreihen wird für die Auswertung zum einen mit Hilfe der Excel-Funktion „Trendlinie“ wiedergegeben und zusätzlich manuell nachgezeichnet, um den Einfluss von Ausreißern zu minimieren. Die Ergebnisse beider Verfahren für die Bestimmung der Populationsumkehr können aus den Schnittpunkten der Geraden abgelesen werden und sind in ►Tab. 3.7 aufgelistet.

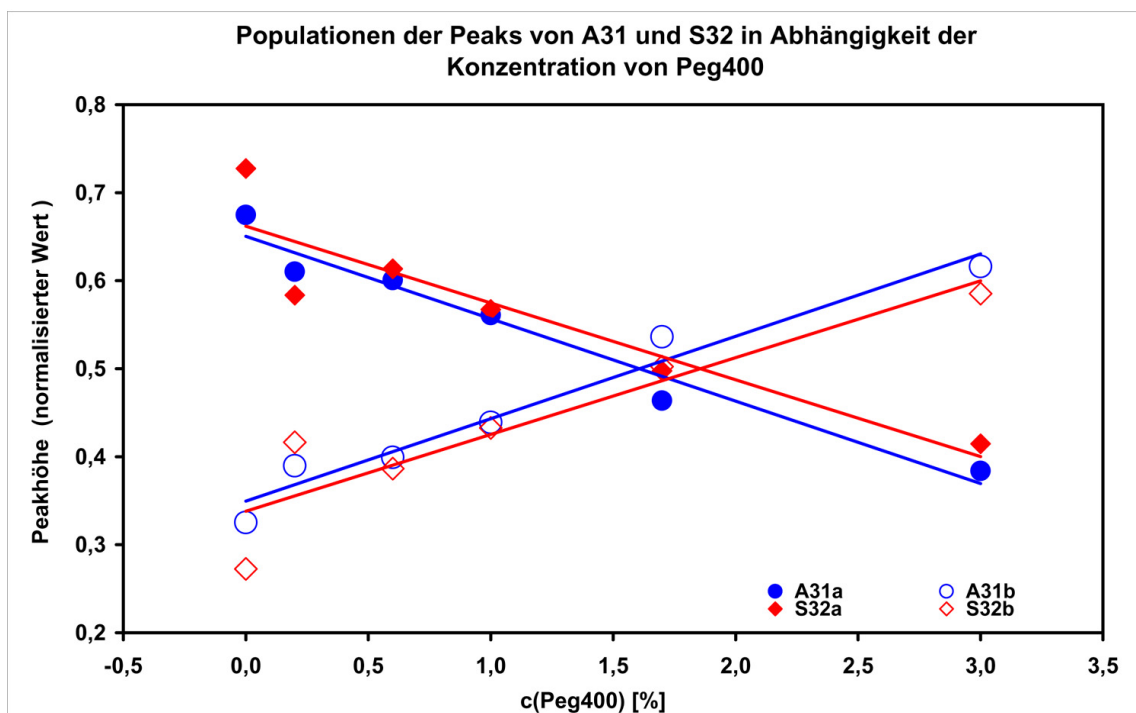


Abb. 3.11: Beispiel für den Verlauf der Populationsumkehr in Abhängigkeit von der Konzentration an Peg400 anhand der Signale der Aminosäuren A31 und S32. Zusätzlich sind die Trendlinien eingezeichnet.

Tab. 3.7: Populationsumkehr der aufspaltenden Peaks. Da der Verlauf der Daten nicht immer so gut beschrieben werden kann, wurden zusätzlich die Verläufe per Hand nachgezeichnet (in Diagramm ▶Abb. 3.11 nicht dargestellt).

Aminosäure	Schnittpunkte bei c(Peg) [%]	
	Manuell	Trendlinie
W11ε	1,4	1,4
N26	1,5	2,1
T29	0,7	0,3
A31	1,6	1,6
S32	1,7	1,9
E35	2,6	2,6

Werden diese Schnittpunkte gegen die Konzentration von Peg400 aufgetragen, ergibt sich ▶Abb. 3.12.

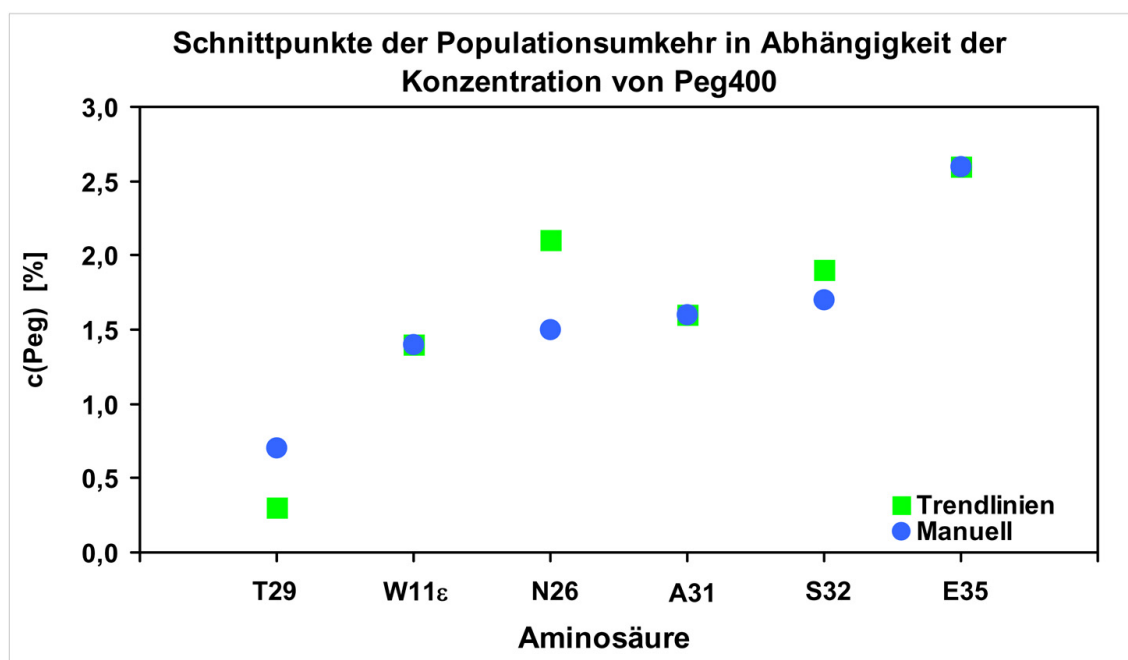


Abb. 3.12: Populationsumkehr von Zustand A in B in Abhängigkeit von der Konzentration von Peg400. Dargestellt werden die in grün die über die Excel-Funktion „Trendlinie“ gefitteten Werte, und in blau die manuell ermittelten Werte. Auftrag der Aminosäuren auf der x-Achse nach steigenden $c(\text{Peg})$, bei denen ihre Schnittpunkten der Populationsumkehr liegen.

Beiden Datenverläufen ist eine feste Reihenfolge der Aminosäuren bei der Populationsumkehr zu entnehmen. Zuerst kehren sich die Populationen für T29 um, dann nacheinander die der Aminosäuren N26, W11ε, A31, S32 und E35. Die Lage der Aminosäuren in der Struktur und die Reihenfolge der Populationsumkehr sind in ►Abb. 3.13 zusammengefasst.

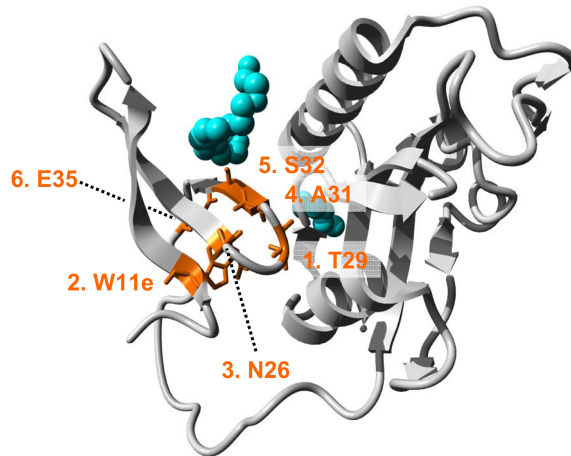


Abb. 3.13: Ranganathan-Struktur 1PIN mit in orange hervorgehobenen Aminosäuren. Die Zahlen beschreiben die Reihenfolge der Populationsumkehr.

Aus den Populationen lässt sich die Freie Enthalpie zwischen Zustand A und B in Abhängigkeit von der Peg400-Konzentration berechnen. Die Ergebnisse sind in ▶Tab. 3.8 aufgelistet, sowie grafisch in ▶Abb. 3.14 dargestellt. Sie spiegelt den Energieunterschied zwischen den beiden Zuständen wider. Ohne Peg400 liegen die Werte für ΔG bei -654 (T29) bis -2459 (S32) J/mol. Sie nimmt mit steigender Peg400-Konzentration auf 375 (E35) bis 1185 J/mol (A31) zu. Zwei Werte in der Tabelle sind rot eingefärbt, da sie nicht der einheitlich steigenden Tendenz folgen und in diesem Fall vermutlich Meßfehler darstellen, die bei der Datenaufnahme entstanden sind.

Tab. 3.8: Freie Enthalpie zwischen den beiden Zuständen von Pin1 in Abhängigkeit von der Konzentration an Peg400

AS c(Peg) [%]	Freie Enthalpie ΔG [J/mol]					
	0	0,2	0,6	1,0	1,7	3,0
W11	-1140	-462	-483	-14	211	827
N26	-1048	-1021	-254	86	255	-113
T29	-654	23	-182	887	1473	1018
A31	-1826	-1122	-1023	-615	365	1185
S32	-2459	-846	-1158	-678	23	862
E35	–	–	-2346	-1513	-951	375

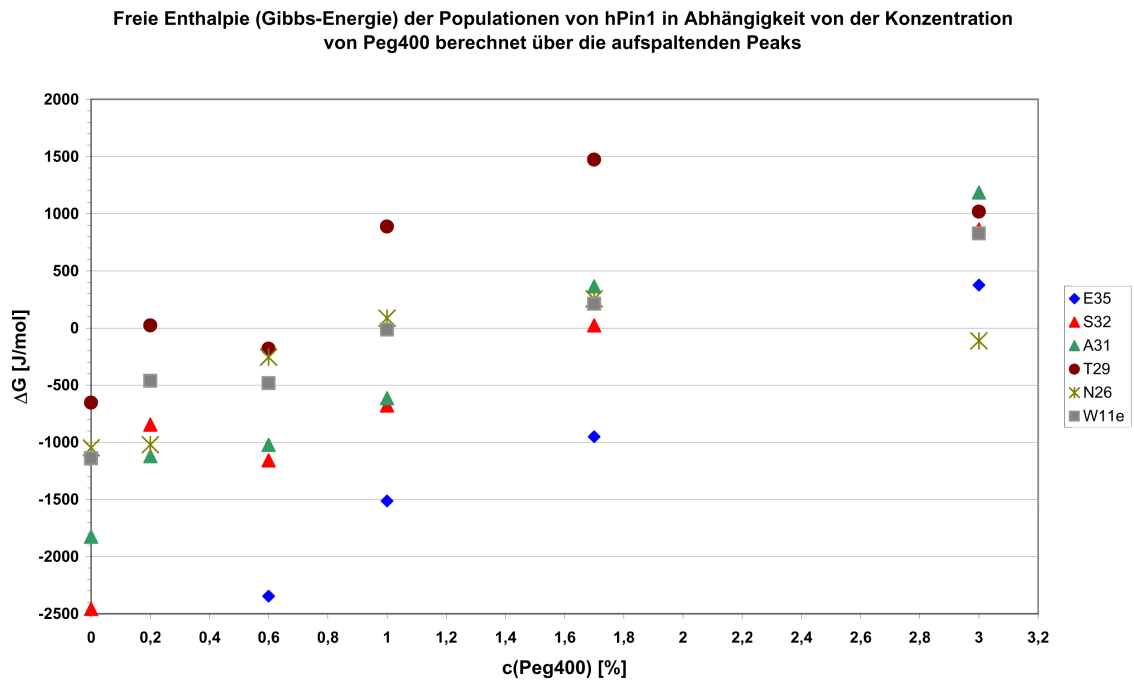


Abb. 3.14: Freie Enthalpie zwischen den beiden Zuständen von Pin1 in Abhängigkeit von der Konzentration von Peg400

3.2.2 Einfluss von Peg auf die Pin-Konstrukte

Um zu klären, ob das Aufsplitten der Peaks durch die Anlagerung von Peg hervorgerufen wird, oder ob es sich um einen durch Peg induzierten Effekt handelt, wurde die Titration unter gleichen Bedingungen mit *shortPin* und *Pin_{WW}* durchgeführt. Beide Versuchsreihen zeigen keine Aufspaltungen, die sich unter zunehmender Konzentration von Peg400 zunehmend stärker ausprägen ▶Abb. 3.15. Für die *shortPin*-Variante sind Anzeichen einer Aufspaltung erkennbar, das Signal des schwächeren Peaks besitzt aber nur weniger als ein Zehntel der Intensität des größeren Peaks und liegt im Rauschbereich des Spektrums, ebenso verhält es sich für den Peak von W11ε. Bei einer Peg400-Konzentration von 3% spaltet zusätzlich A31 auf.

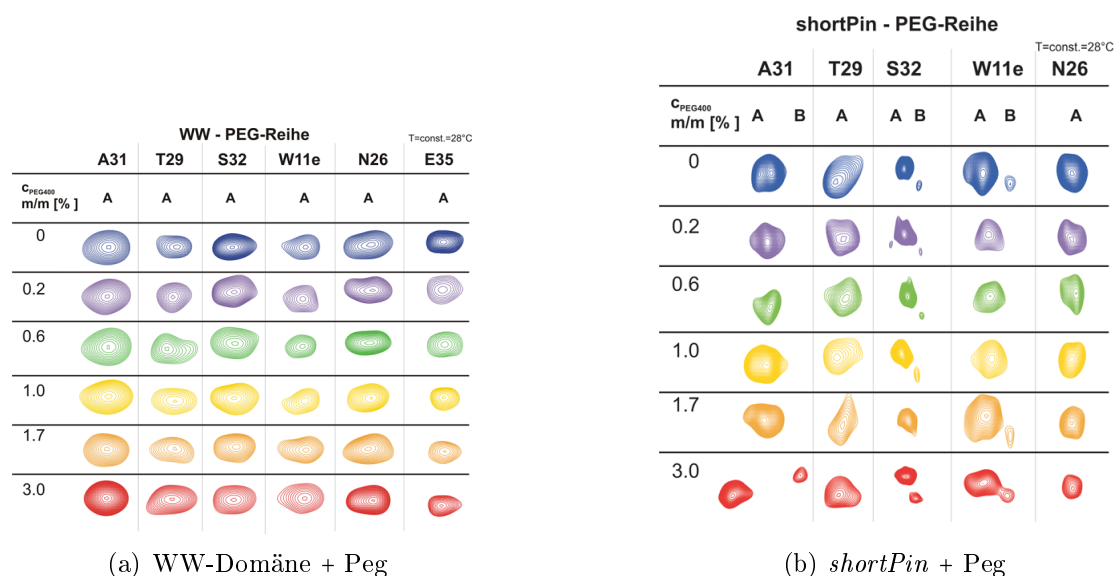


Abb. 3.15: Vergleichsmessreihen mit Pin_{WW} und shortPin

3.3 Messung mit dem Peptid Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA

Die vorangegangenen Messreihen zeigen für Pin_1 zwei Zustände im ^{15}N -HSQC-Spektrum an, die unterschiedlich stark besetzt sind und sich durch Zugabe des Liganden Peg400 in ihrem Besetzungsverhältnis beeinflussen lassen. Jacobs et. al (2003) konnten durch Zugabe von Peptiden zu einer Pin_1 -Probe eine Domäneninteraktion induzieren. Wenn die Aufspaltungen für zwei Konformationen offen und geschlossen stehen, und das Peptid Einfluss auf die Domäneninteraktion hat, sollte die Konzentration des Peptids Einfluss auf das Besetzungsverhältnis der Populationen haben. Um eine funktionelle Relevanz beider Zustände nachzuweisen, wird in dieser Messreihe der Einfluss eines Peptids mit pSer-Pro-Motiv untersucht. In dieser Messreihe wurde das Peptid Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA [Abb. 3.16](#) verwendet. Dafür wurde einer 200 μM Pin_1 -Lösung das Peptid in einzelnen Schritten zutitriert [Tab. 2.6](#). Die Endkonzentration an Peptid in der Lösung betrug nach den einzelnen Titrationschritten 0 μM , 80 μM , 200 μM , 400 μM , 800 μM , 1400 μM , 2320 μM . Nach jedem Titrationschritt wurde ein ^{15}N -HSQC-Spektrum aufgezeichnet. Wie auch bei der Messreihe mit Peg400 wurden die einzelnen Spektren der Messreihe überlagert und die Resonanzen auf Aufspaltungen und Verschiebungen untersucht. Das verwendete Peptid besitzt für die Erkennung durch Pin_1 ein pSer-Pro-Motiv. Um das Konstrukt auch für evtl. Aktivitätstests verwenden zu können, wurde ein para-Nitroanilin-Rest (pNA) angehängt.

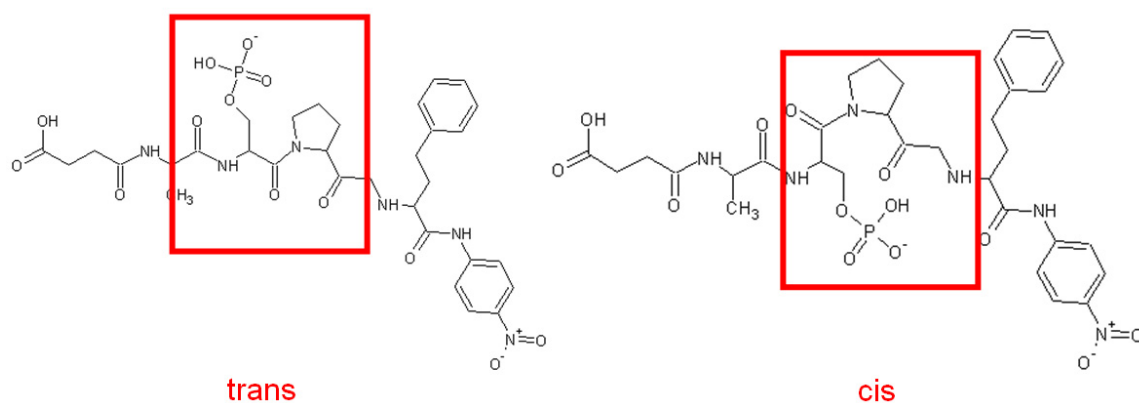


Abb. 3.16: cis-/trans-Konformation des Peptids Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA.

3.3.1 Ergebnisse der Peptidmessung

3.3.1.1 Einfluss des Peptids auf die chemische Verschiebung von ^{15}N -HSQC-Resonanzen

Bei Zugabe des Peptids mit der Sequenz *Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA* verschieben sich Resonanzen im ^{15}N -HSQC-Spektrum, einige spalten auch auf. Die Aufspaltungen werden in [Kap. 3.3.1.2](#) beschrieben. Einen Vergleich, welche Resonanzen aus Bindungsregionen sich unter Einfluss des Peptids verschieben und/oder aufspalten zeigt [Tab. 6.1](#) im Anhang.

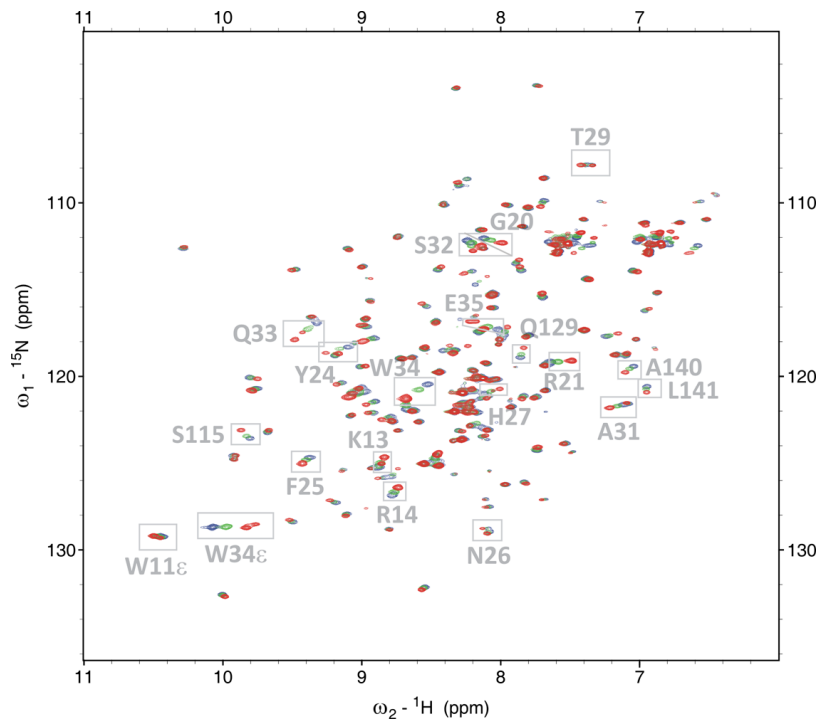


Abb. 3.17: Titration mit dem Peptid Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA. Dargestellt sind Peaks die Aufspalten und/oder deutliche Verschiebungen zeigen.

Die maximale Distanz der Verschiebung wird bei der höchsten Peptidkonzentration erreicht und ist für alle 120 zugeordneten Peaks in ▶Abb. 3.19 als Balkendiagramm dargestellt. Das obere Diagramm (a) zeigt eine Übersicht aller A-Peaks aus WW- und PPIase-Domäne, das untere (b) einen Vergleich der Shifts von A- und B-Peaks aufspaltender Signale. Die Shifts wurden ihrer Shift-Länge nach in drei Kategorien eingeordnet: Peaks, die über eine kurze Distanz shiften ($<0,02$ ppm), Peaks, die über vergleichsweise große Distanz shiften ($>0,1$ ppm) und die Peaks, deren Werte dazwischen liegen. Insgesamt verschieben sich 12 Signale über eine Distanz von mehr als 0,1 ppm, davon 5 aus der WW-Domäne (S16, G20, R21, Q33, E35). 35 Signale zeigen mit Werten von $<0,2$ ppm vergleichsweise kurze Shifts.

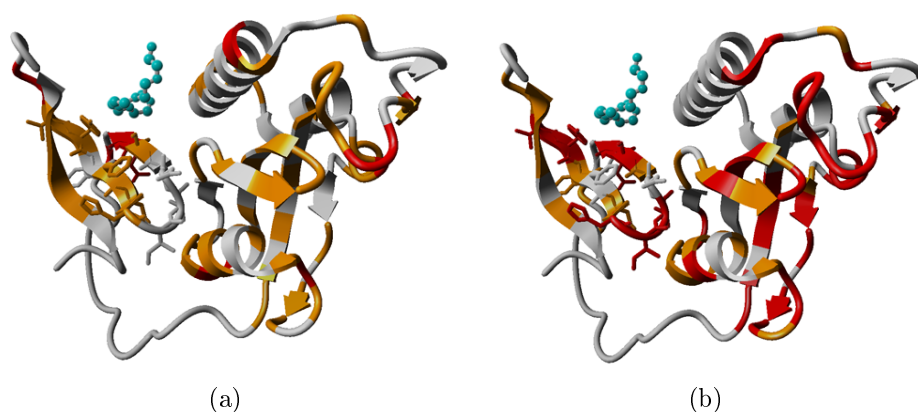
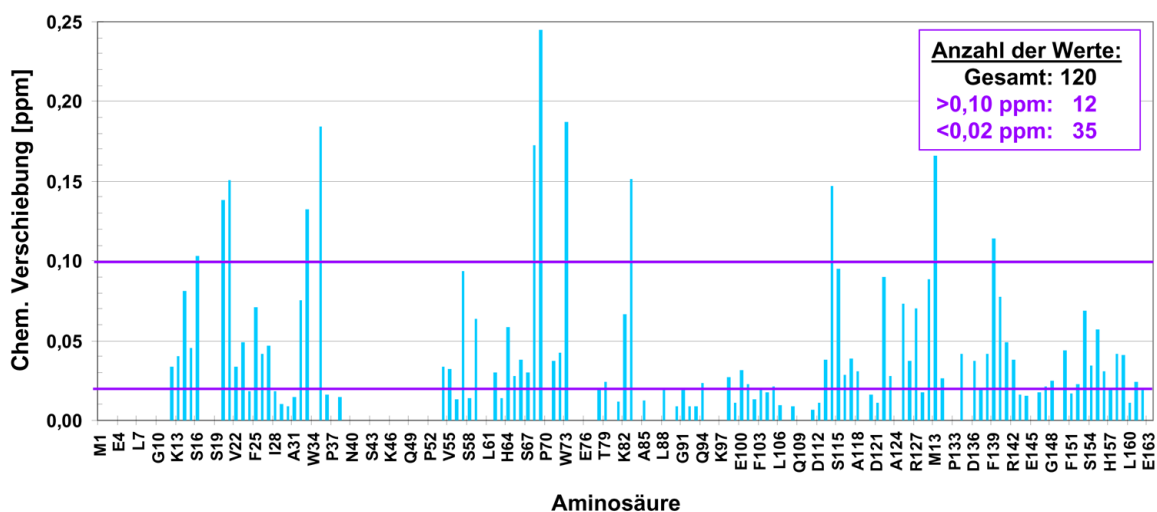


Abb. 3.18: Projektion der Chemischen Verschiebung (a) und der K_D -Werte (b) auf die Kristallstruktur 1PIN mit eingelagertem Peg400-Molekül (cyan). a) Die Resonanzen sind nach der Distanz ihrer Chemischen Verschiebung eingefärbt: orange – 0,02–0,05 ppm, rot – $>0,1$ ppm, grau – keine Verschiebung bzw. keine Ergebnisse. b) Einfärbung nach den K_D -Werten: orange – 400–1000 μM , rot – >1000 μM , grau – keine Fitergebnisse verfügbar. Die in Anwesenheit des Peptids aufspaltenden Aminosäuren V22-Q33 und E35 sind als *Sticks* hervorgehoben.

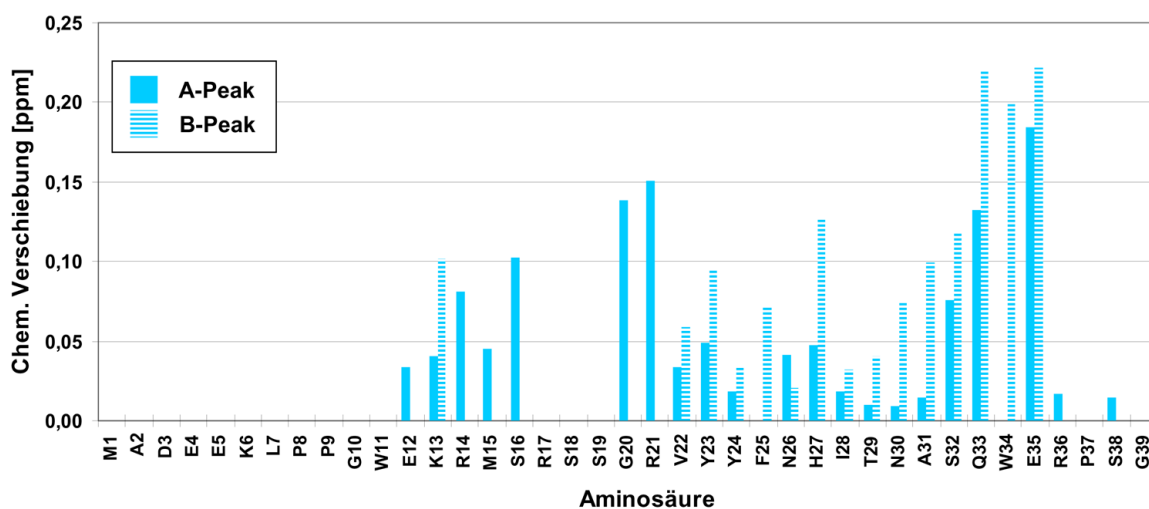
Beim Vergleich der A- und B-Peaks (b) fällt auf, dass die B-Peaks stärkere Verschiebungen aufweisen, die zum Großteil mehr als doppelt so groß sind, wie die der A-Peaks. Über die Verschiebungen der Peakpositionen bei steigender Konzentration an Peptid wurden nach ►Gl. 2.8 (►Kap. 3.2.1) die K_D -Werte gefittet, die auszugsweise in ►Tab. 3.9 aufgeführt werden. Die vollständige Auflistung findet sich im Anhang ►Tab. 6.4, ebenso wie vier beispielhafte Fitergebnisse ►Abb. 6.5, die mit der Software Matlab berechnet wurden.

Shift-Distanzen der Signale von Pin1 unter Einfluss des Peptids Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA



(a) Verschiebungen für Peaks von Pin1 unter Einfluss von 2320 μM Peptid. Die B-Peaks aufspaltender Signale sind in dieser Abb. nicht dargestellt (s. Abb. (b)).

Shift-Distanzen der Signale der WW-Domäne von Pin1 unter Einfluss des Peptids Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA



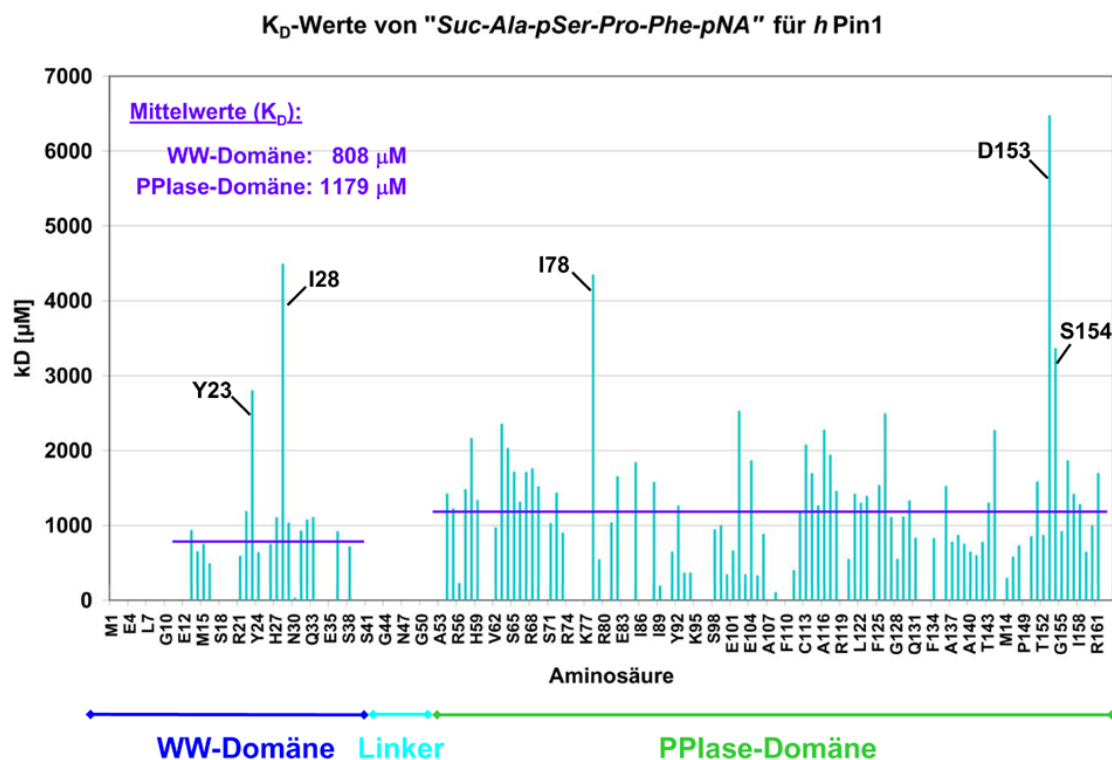
(b) Vergleich der Verschiebungen von Peaks der WW-Domäne von Pin1 unter Einfluss von 2320 μM Peptid.

Abb. 3.19: Chemische Verschiebung unter Einfluss von 2320 μM Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA. Ein Vergleich von Shifts von A- und B-Peaks aufspaltender Aminosäuren ist in Abb. (b) dargestellt.

Tab. 3.9: Ergebnis des Matlab-Fits für die Titration mit dem Peptid Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA. Aufgelistet sind die Ergebnisse für aufspaltende Aminosäuren. Neben der Nummer der Aminosäure (AS) werden die Dissoziationskonstante (K_D) und die Standardabweichung (Stabw) angegeben. Die Ergebnisse der restlichen Aminosäuren können ▶Tab. 6.4 im Anhang entommen werden.

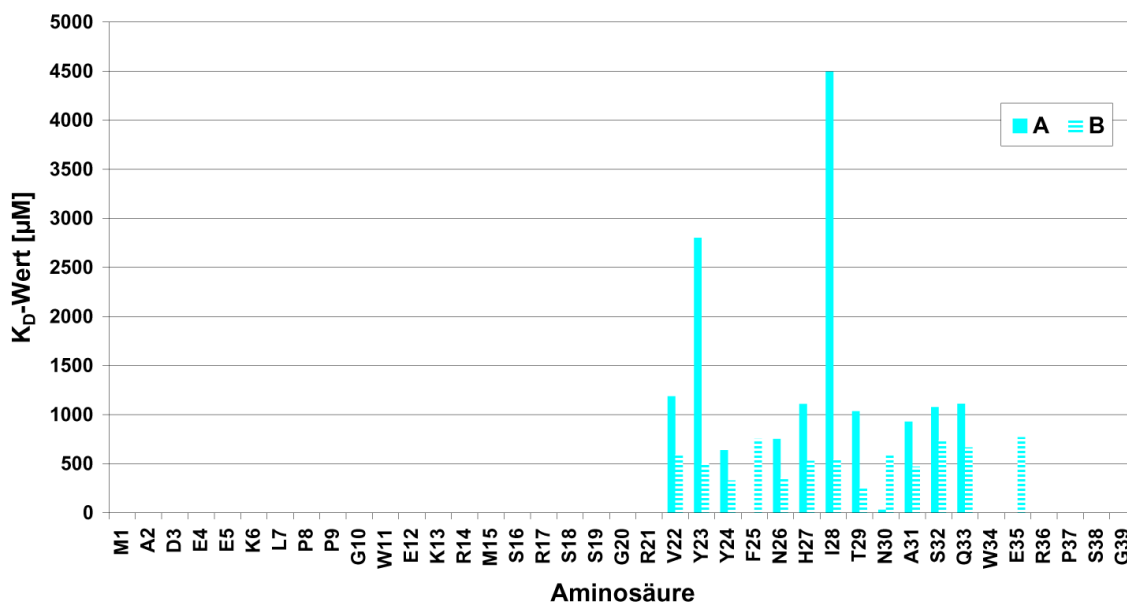
AS	ΔF_{max}	K_D [μM]	Stabw
K13a	1,4435	936	5,48E-02
K13b	1,2532	506	3,25E-02
Y24a	1,2932	638	1,34E-02
Y24b	1,1520	329	7,49E-02
N26a	1,3796	752	2,80E-02
N26b	1,2109	358	4,83E-02
H27a	1,5583	1107	3,40E-02
H27b	1,2544	529	1,31E-02
T29a	1,4662	1034	4,33E-02
T29b	1,1047	254	5,41E-02
A31a	1,5242	928	6,16E-02
A31b	1,2380	468	1,66E-02
S32a	1,5394	1075	3,98E-02
S32b	1,3546	740	1,11E-02
Q33a	1,5824	1109	9,49E-02
Q33b	1,3380	666	1,53E-02
Mittelwert a:		947	
Mittelwert b:		481	

Es werden alle Ergebnisse dargestellt, für die sowohl für den A- als auch für den B-Peak ein Wert vorliegt. Auffällig ist, dass die Dissoziationskonstanten für die A-Peaks im Mittel doppelt so hoch liegen, wie für die B-Peaks. Insgesamt betrachtet bindet demnach die geschlossene Konformation, der der B-Peak zugeordnet wird, das Peptid besser, als die offene. Ein Vergleich zwischen den Werten der WW- und PPIase-Domäne ist in ▶Abb. 3.20 in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Der gemittelte Wert für die WW-Domäne liegt mit $808 \mu\text{M}$ niedriger als der für die PPIase-Domäne mit $1179 \mu\text{M}$. Vier K_D s fallen auf, die über $3000 \mu\text{M}$ liegen (I28, I78, D153, S154). Da diese im Vergleich zu den anderen Werten als einzige fast um das dreifache höher liegen, wurden sie von der Mittelwertberechnung ausgeschlossen.



(a) K_D -Werte für das Peptid Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA an Pin1.

Vergleich der K_D -Werte für die A- und B-Populationen von *h* Pin1 unter Einfluss des Peptids Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA



(b) Vergleich der K_D -Werte beider Populationen.

Abb. 3.20: Gefittete K_D -Werte für das Peptid Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA an Pin1. Berechnet über Chemische Verschiebungen in den ^{15}N -HSQC-Spektren bei Konzentrationen von 0–2320 μ M Peptid.

In ▶Abb. 3.20 wird deutlich, dass die Aminosäuren der Peptid-Bindungsseite (H59, C113, S154 und H157) und ihre direkten Nachbarn vergleichbare K_D -Werte im Bereich von 1200 μM aufweisen. Im Vergleich mit denen der WW-Domäne ($\approx 600 \mu\text{M}$) liegen sie fast um das doppelte höher. Dies ist ein Hinweis darauf, dass das Peptid strukturell nicht gut an die Bindungsregion der PPIase-Domäne angepasst ist, in der sich auch das aktive Zentrum befindet. Möglicherweise wird eine stärkere Bindung durch den pNA-Rest des Peptids sterisch behindert.

Aufspaltungen werden in dieser Messreihe nur für Peaks der WW-Domäne detektiert. Das Peptid bindet im mikromolaren Bereich aber es induziert keine Populationsumkehr und damit auch nicht die Domäneninteraktion in der Form, dass der zweite Zustand unter Peptideinfluss an Dominanz gewinnt.

3.3.1.2 Das Peptid Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA induziert Aufspaltungen im ^{15}N -HSQC-Spektrum

Unter Zugabe des Peptids spalten einige Signale auf, die aus den Spektren ausgelesen wurden und in ▶Abb. 3.21 zusammengefasst sind. Der Peak von G148, der in der Peg-Reihe bei hohen Konzentrationen aufspaltet, wird der Vollständigkeit halber aufgeführt, zeigt aber keine Verschiebung oder Aufspaltung in dieser Messreihe.

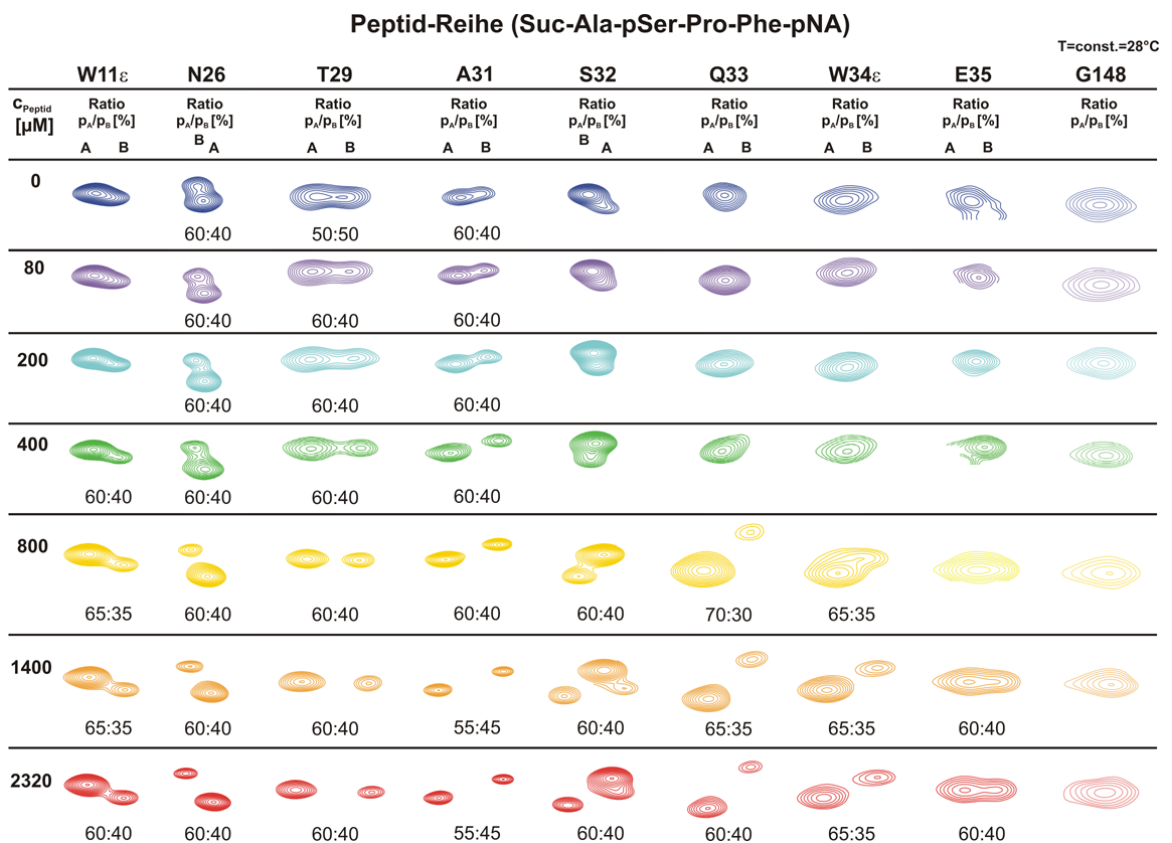


Abb. 3.21: Titration mit dem Peptid Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA. Die Tabelle gibt die Aufspaltung der Peaks und das Verhältnis der Populationen in Abhängigkeit der Konzentration des Peptids wider. Die Verhältnisse sind jeweils unter den Peaks aufgeführt. Die Werte sind auf die Zehnerstelle gerundet.

Für die Peaks W11ε, N26, T29, A31, S32, Q33, W34ε und E35 in der WW-Domäne zeigt sich mit zunehmender Konzentration an Peptid eine zunehmende Aufspaltung bei konstant bleibendem Verhältnis der Populationen. In ▶Abb. 3.17 ist zu erkennen, dass sich Signale verschieben. Das ausgewählte Peptid induziert für Pin1 im Spektrum deutlich erkennbare Verschiebungen von Peaks in beiden Domänen und Aufspaltungen für Peaks der WW-Domäne von Pin1 bei einer Temperatur von 28°C. Die Aufspaltungen der Peaks in der WW-Domäne verstärken sich mit zunehmender Peptidkonzentration. Die Populationen stehen im Verhältnis von ca. $\frac{60\%}{40\%}$ und werden in dieser Messreihe nur wenig beeinflusst. Veränderungen in der Population zeigen die Peaks von T29 ohne Peg ($\frac{50\%}{50\%}$) sowie A31, Q33 und W34 bei Konzentrationen $\geq 800 \mu\text{M}$.

Über die Aufspaltungen einiger Signale wurden auch für diese Messreihe die Freien Enthalpien berechnet, um Aussagen über den Einfluss des Peptids auf die zwei Zustände zu überprüfen. Die Berechnungen der Freien Enthalpie ergaben keine einheitliche Tendenz für eine Zu- oder Abnahme unter Zugabe des Peptids ▶Tab. 3.10.

Für die Peaks W11 ϵ , S32, Q33, W34 und E35 sind erst bei höheren Konzentrationen Enthalpieberechnungen möglich, da die Überlagerung der Peakteile A und B das Auslesen der genauen Intensitäten für das kleinere Signal nicht ermöglichte.

Die Werte für den Peak W11 ϵ bleiben über die Titrationsschritte hinweg nahezu konstant bei ≈ -1400 J/mol, die der Aminosäure A31 nehmen nach Durchschnittswerten von ≈ -1000 J/mol bei Konzentrationen von 0–400 μ M Peptid auf ≈ -400 J/mol bei 2320 μ M Peptid zu. Die Auswertung ergibt für vier der acht Aminosäuren Freie Enthalpien von ca. -1400 J/mol bei Konzentrationen über 800 μ M zwischen beiden Zuständen. Die anderen Werte liegen zwischen -400 und -600 J/mol.

Tab. 3.10: Freie Enthalpie zwischen den beiden Zuständen von Pin1 in Abhängigkeit von der Konzentration des Peptids

AS c(Peptid) [μ M]	Freie Enthalpie [J/mol]						
	0	80	200	400	800	1400	2320
W11 ϵ				-1361	-1441	-1414	-1216
N26	-704	-636	-679	-881	-1183	-912	-725
T29	-149	-631	-596	-590	-598	-717	-556
A31	-957	-1046	-1141	-1059	-582	-414	-379
S32					-1203	-1351	-1082
Q33					-1714	-1440	-1125
W34					-1521	-1549	-1536
E35						-631	-651

Insgesamt bleiben die Werte der Freien Energien auch mit steigender Peptidkonzentration relativ konstant.

3.4 Relaxationsmessungen

Es wurden zwei Experimente aufgesetzt, in denen die Relaxationszeiten (T1 und T2) für die Amidprotonen von Pin1 ohne Ligand und in Anwesenheit des Liganden Peg400 bestimmt wurden. Das Verhältnis von T1 über T2 kann über die „*Rotations-Korrelationszeit*“ τ_c mit der Masse von Molekülen korreliert werden ▶[Kap. 3.4.1](#). Pin1 hat zwei Domänen, die über einen flexiblen Linker miteinander verbunden sind. Jacobs et al. ([Jacobs et al., 2003](#)) beschreiben ein Modell, mit dem sie den Einfluss von Peptiden auf Pin1 untersuchen. Dabei werden die beiden Domänen von Pin1 als voneinander unabhängige Kugeln betrachtet. Eine Betrachtung als unabhängige Kugeln ist zulässig, da die Bindung über den Linker sehr flexibel ist.

Die Ergebnisse beider Messungen werden miteinander verglichen. Wenn die Domä-

neninteraktion durch den Liganden verstärkt wird, müssten sich die Relaxationszeiten nach dessen Zusatz erhöhen, denn das korrelierte Gewicht für die beiden Domänen wäre nicht mehr unabhängig voneinander. WW- und PPIase-Domäne würden sich gegenseitig „vergrößern“ und es müsste eine Massenzunahme zu registrieren sein. Um aussagekräftige Werte für die Molekularmassen der Domänen zu erhalten, müssen sehr flexible Bereiche, deren Relaxationszeiten stark vom Mittelwert abweichen, aus der Berechnung herausgenommen werden. Sie „verfälschen“ die Mittelwerte. Einen weiteren Anhaltspunkt für die Flexibilität von Aminosäuren innerhalb der Struktur bieten HetNOEs ▶Kap. 2.1.5. Wenn das Verhältnis der HetNoe-Peaks, die einmal in gesättigten und einmal in ungesättigten Spektren aufgenommen wurden, unter dem Wert von 0,65 ▶Kap. 2.1.4 liegt, deutet das darauf hin, dass die NH-Gruppe (und damit die Aminosäure) innerhalb der Domäne vergleichsweise frei beweglich ist und somit nicht zu einer charakteristischen Beschreibung der „Domänenbeweglichkeit“ beitragen kann. Diese Strategie kann auch zur Messung der Domäneninteraktion von Pin1 bei Zugabe von Peg verwendet werden. In dieser Messreihe wird Peg als Ligand untersucht. Wenn Peg die Domäneninteraktion beeinflusst, sollte sich das Molekulargewicht der Domänen im Mittel erhöhen, da sie durch den Liganden zu einer Einheit, sozusagen einer großen Kugel, „verklebt“ werden. Mit Hilfe von Relaxationsmessungen sollte sich das auf diesem Wege nachweisen lassen. Die folgende Messreihe wurde mit Relaxationszeiten von $\tau = 20$ ms, 100 ms, 140 ms, 180 ms, 200 ms, 300 ms, 500 ms, 750 ms, 1000 ms und 1400 ms für T1 sowie 10 ms, 30 ms, 50 ms, 70 ms, 90 ms, 110 ms, 130 ms, 150 ms, 170 ms, 190 ms und 210 ms für T2 durchgeführt.

3.4.1 Ergebnisse der Relaxationsmessungen

Die NMR-Daten der Relaxationsmessungen wurden nach ▶Gl. 2.9 gefittet und anschließend die Ergebnisse für T1 und T2 verglichen und ins Verhältnis gesetzt. Mit Hilfe eines HetNoe werden zu flexible Bereiche, die die Mittelwerte in Bezug auf die Domänenensemble verfälschen, herausgefiltert und von der Berechnung der Mittelwerte ausgeschlossen ▶Kap. 3.4. Zur Auswertung des Kugelmodells der beiden Domänen werden die T1/T2-Verhältnisse für die Aminosäuren der einzelnen Domänen gemittelt (1-39 WW, 50-163 PPIase). ▶Abb. 3.23 (oben und Mitte) zeigen, dass sich bei mehreren Aminosäuren in der WW- und in der PPIase-Domäne die Relaxationszeiten bei Zugabe von Peg ändern. Das wirkt sich auch auf das Verhältnis von T1/T2 aus (unten). Für eine möglichst genaue Beschreibung der Molekularmassen der Domänen werden an dieser Stelle zunächst über das HetNOE flexible Bereiche identifiziert ▶Kap. 2.1.5.

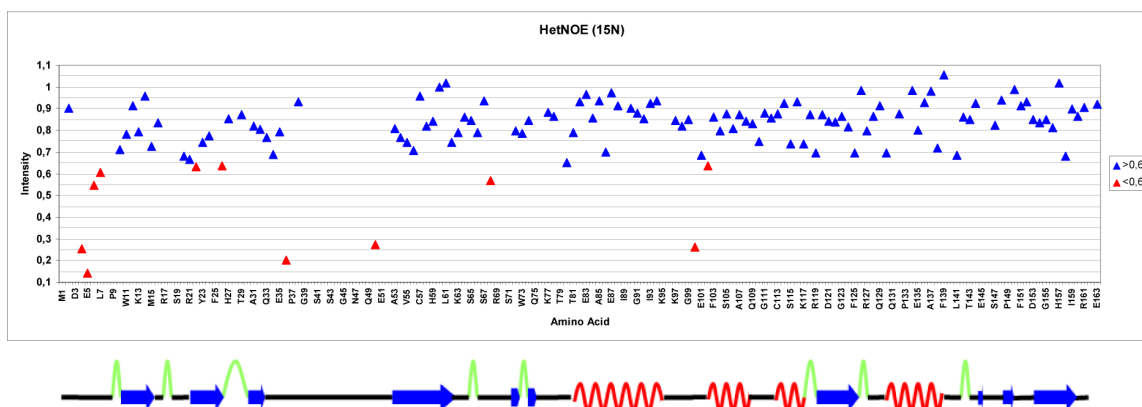


Abb. 3.22: Ergebnis der HetNOE-Messung von Pin1_f. Werte unter 0,65 stehen für sehr flexible Bereiche. Diese werden aus der Berechnung ausgeschlossen und sind in dieser Abbildung in rot hervorgehoben.

Die meisten Verhältnisse von P_{sat}/P_{unsat} liegen über einem Wert von 0,65 ▶Abb. 3.22 und können in die Mittelwertberechnung von T1/T2 (s.u.) mit einfließen. Ausgeschlossen werden die Werte für die Aminosäuren A2, K6, L7, V22a, N26, N30a, W34ε und R36 in der WW-Domäne sowie G50, R68, E100 und D102 in der PPiase-Domäne, da sie zu niedrig liegen.

▶Abb. 3.23 stellt die Fit-Ergebnisse der T1- und T2-Messungen dar, welche auch in Zahlenform in ▶Tab. 3.11 zusammengefasst sind. Die daraus berechneten Verhältnisse von T1 über T2 finden sich im unteren Diagramm der Abbildung sowie in den unteren Spalten der Tabelle. Um besser erkennen zu können, in welchen Strukturbereichen von Pin1 Zu- bzw. Abnahmen der Relaxationszeiten zu verzeichnen sind, werden in ▶Abb. 3.24 die Differenzen der berechneten Molekularmassen (T1/T2) der Messung ohne und mit 2% Peg in Form eines Balkendiagramms dargestellt sowie darunter eine Projektion der Sekundärstruktur. Die größten Unterschiede ergeben sich für die in der Abbildung gekennzeichneten Aminosäuren Y23 (−1,3) und N26 (−2,3) in der WW-Domäne, sowie E84 (+0,8), F110 (+0,8), K132 (+0,9), F134 (+0,6), A137 (+0,8), L141 (+0,8), S154 (−0,5) und R161 (−2,1) in der PPiase-Domäne.

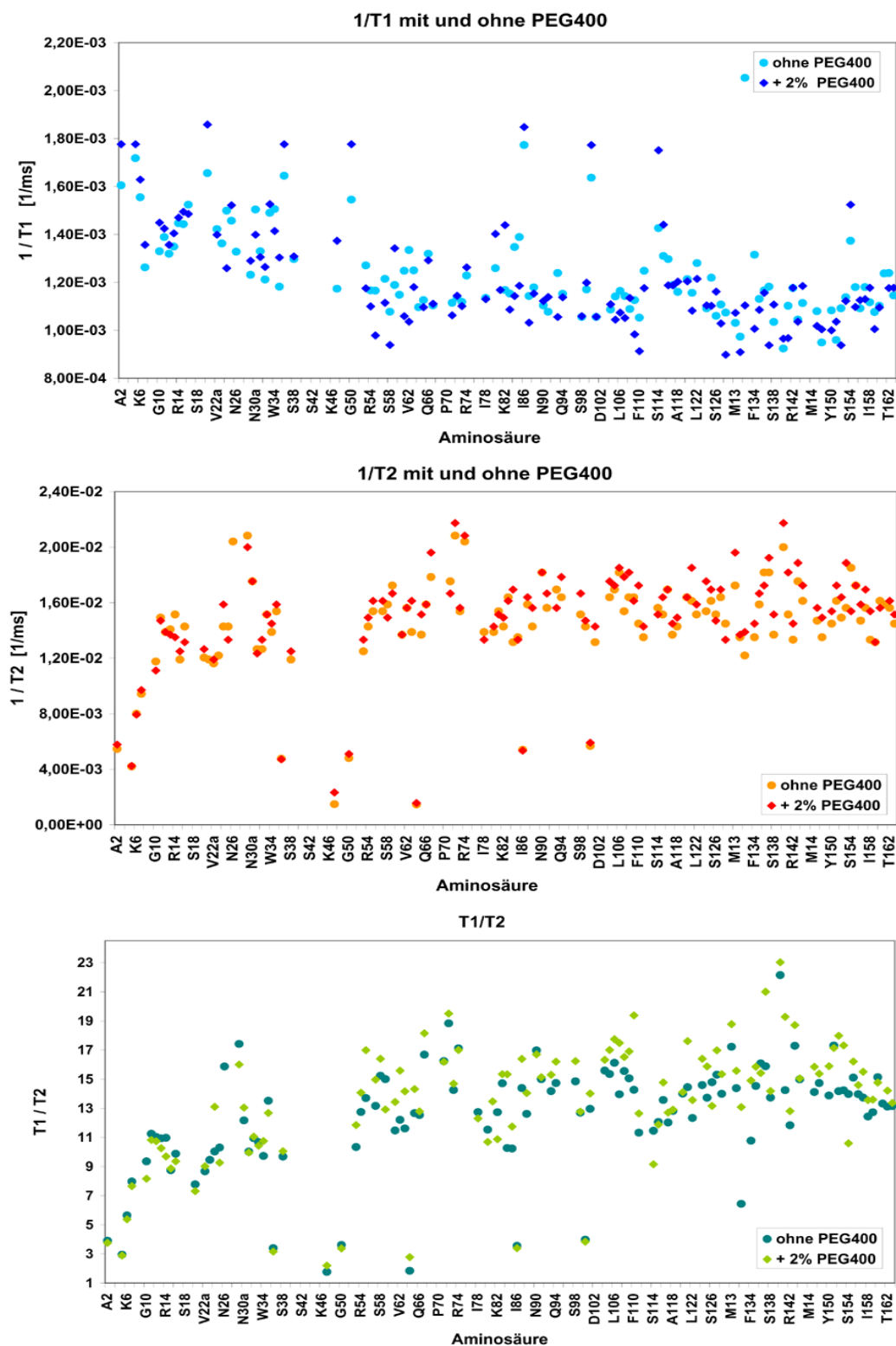


Abb. 3.23: Veränderung der T1-(oben) und T2-Zeiten (mitte) der einzelnen Aminosäuren von Pin1_{fl} unter Einfluss von Peg. Im unteren Diagramm werden T1- und T2-Zeiten ohne und in Anwesenheit von 2% Peg ins Verhältnis gesetzt.

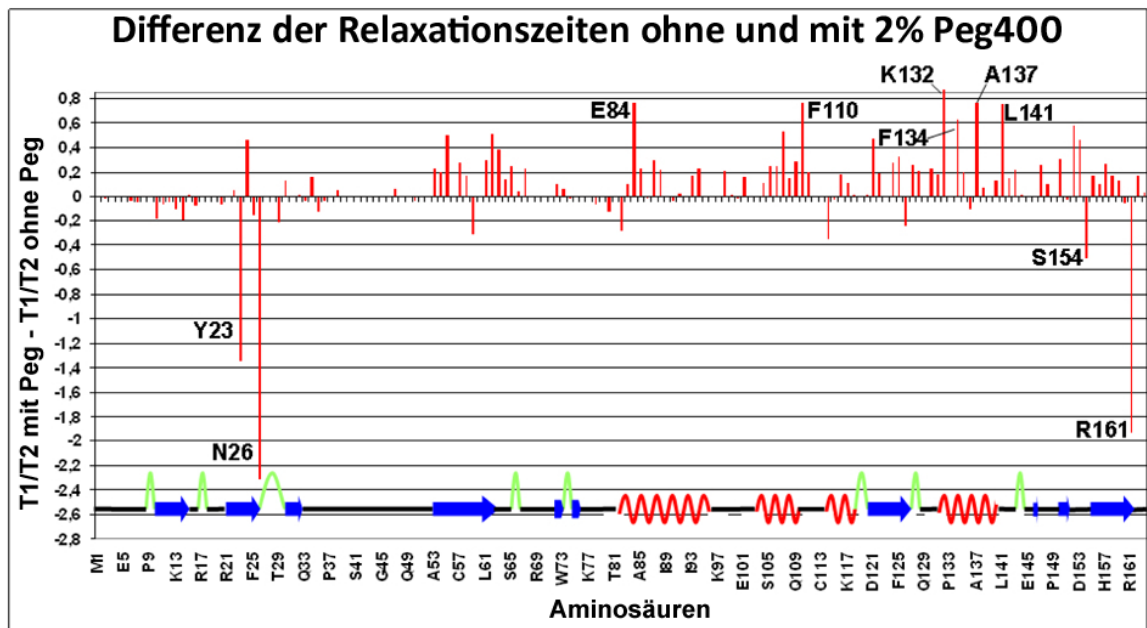


Abb. 3.24: Relaxationszeiten der einzelnen Aminosäuren von Pin1_{fl}. Die Aminosäuren, für die sich die stärksten Veränderungen ergeben, sind im Diagramm gekennzeichnet.

Tab. 3.11: Mittelwerte von T1/T2 der Relaxationsmessungen für die WW- und PPIase-Domäne. Ohne und mit 2% Peg. Die Berechnungen beruhen auf n gemittelten Werten. n(WW)=23, n(WW+Peg)=21, n(PPIase)=86, n(PPIase+Peg)=86. Nach Ausschluss einiger Werte über das HetNOE reduziert sich die Anzahl für die WW-Domäne um 6 und für die PPIase-Domäne um 5 Werte. τ_c = Rotations-Korrelationszeit.

	ohne Peg				mit 2% Peg			
	mit allen AS		nach Ausschluss		mit allen AS		nach Ausschluss	
	T1 [ms]	T2 [ms]	T1 [ms]	T2 [ms]	T1 [ms]	T2 [ms]	T1 [ms]	T2 [ms]
WW	706	94	719	75	673	76	706	74
PPIase	857	77	864	74	897	73	906	71
T1/T2								
WW	7,5		9,6		8,9		9,5	
PPIase	11,2		11,6		12,2		12,8	
τ_c [ns]								
WW	8,1		9,3		8,9		9,3	
PPIase	10,0		10,0		11,0		11,0	

► **Abb. 3.25** zeigt beispielhaft das Fitergebnis für T1 und T2 anhand des Signals von A31. Die mittlere Standardabweichung² für die T1-Fits beträgt $2,19 \cdot 10^5$, für die

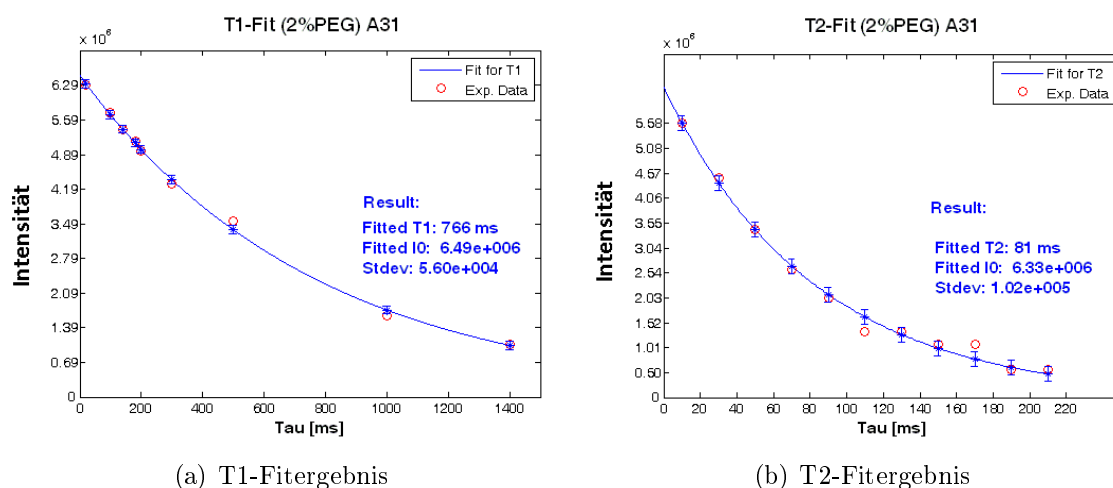


Abb. 3.25: Beispiel eines Fits für T1 und T2 für das Signal von A31. Die Messdaten sind in Form von roten Kreisen dargestellt, das Fitergebnis inklusive Standardabweichung als blaue Linien.

T2-Fits $1,59 \cdot 10^5$. Die Auswertung der T1- und T2-Zeiten zeigt nur minimale Veränderungen in Anwesenheit von Peg. Auch der Ausschluss von Aminosäuren über das HetNoe verändert dieses Bild kaum. Für die WW-Domäne liegen die Ergebnisse vor und nach Ausschluss von Werten für die Messung ohne Peg um jeweils 3 ms auseinander (T1: 706:703 ms und T2: 94:97 ms). Für die Werte der PPIase-Domäne sind für T1 (857:864 ms) und T2 (77:74 ms) auch nur geringe Veränderungen zu verzeichnen. Die Ergebnisse aus der Messreihe ohne Peg liegen ebenfalls sehr nah beieinander. Für die weitere Betrachtung werden lediglich die Werte nach Ausschluss der flexiblen Bereiche herangezogen (Jacobs et al., 2003).

Im Vergleich der Fitergebnisse ohne und mit Peg, sinken die T1-Werte für die WW-Domäne von 719 auf 706 ms, für T2 von 75 auf 74 ms. Die T1-Werte der PPIase-Domäne steigen von 864 auf 906 ms, die T2-Werte fallen von 74 auf 71 ms. Das Verhältnis von T1/T2 (nach Ausschluss) beträgt für die WW-Domäne ohne Peg 9,6 und sinkt nach Zugabe des Liganden auf 9,5 an (-0,1). Für die PPIase-Domäne ergeben sich 11,6 und 12,8 (+1,2).

Aus den Mittelwerten der Relaxationszeiten der Amidprotonen einer Domäne lässt sich nach ▶Gl. 3.2 (Fushman et al., 1994) τ_c berechnen und daraus deren Molekulargewicht ableiten.

²die Peakhöhen für den Fit wurden nicht normalisiert, daher erscheinen die Werte für die Standardabweichung sehr hoch

$$\tau_c = \frac{1}{2 \times \omega_N} \times \sqrt{6 \times \frac{T_1}{T_2} - 7} \quad (3.2)$$

$$\begin{aligned} \omega_N &= 2 \times \pi \times \nu = 2 \times \pi \times 60,79 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1} \\ &= 3,82 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1} \end{aligned}$$

$$\tau_c = \frac{1 \text{ s}}{2 \times 3,82 \cdot 10^8 \times \pi} \times \sqrt{6 \times \frac{T_1}{T_2} - 7}$$

ω_N = Winkelgeschwindigkeit, ν = Larmorfrequenz in Hz, $\frac{T_1}{T_2}$ = Verhältnis der Relaxationszeiten für T1 und T2

►[Tab. 3.12](#) enthält Literaturwerte mit Korrelationszeiten von Proteinen und deren Molekulargewicht. ►[Abb. 3.26](#) zeigt die Werte in einem Diagramm. Über die Geradengleichung lassen sich daraus die Molekulargewichte der Domänen von Pin1 berechnen.

Tab. 3.12: τ_c -Werte für Proteine mit Molekularmassen im Bereich von 2,7–42 kDa zur Bestimmung der Molekularen Massen der WW- und der PPIase-Domäne über die Relaxationszeiten.

Mw [kDa]	Tauc [ns]	Protein
2,7	1,4	Motilin
2,9	1,3	Mellitin (random coil)
3,0	1,4	Zinc finger Xfin-31
6,5	4,2	Protein G
8,6	4,1	Calbinding D _{9k} (apo)
8,6	4,3	Calbinding D _{9k} Ca ²⁺
9,9	7,1	Defunct domain of CaVP
10,2	5,2	Barstar
11,0	4,2	Ribonuclease T1
11,4	4,2	Mellitin
11,7	10,1	Thioredoxin (reduced)
11,7	10,5	Thioredoxin (oxidized)
11,7	4,6	Carp parvalbumin
14,3	5,7	Lysozyme
14,7	4,7	Azurin
18,0	9,1	Staphylococcal nuclease
18,9	12,1	hGranulocyte colony stimulation factor ¹
26,8	17,9	Δ^5 – 3–Ketosteroid Isomerase
42,0	26,0	Acyl carrier protein synthase

Quellen: ([Damberg et al., 2002](#)); ¹([Clubb, 1995](#))

Man erhält ein τ_c von 9,3 ns für die WW-Domäne mit und ohne Peg sowie 10,0 ns und 11,0 ns für die PPIase-Domäne (mit und ohne Peg). Beide Ergebnisse weichen von den erwarteten Werten für die WW-Domäne (4 kDa) von ca. 2 ns und für die PPIase-Domäne (14,3 kDa) ab. Die Beschreibung der Pin-Peg-Interaktion im Sinne einer Domäneninteraktion scheint mit Hilfe des Relaxationsmodells nicht möglich zu sein.

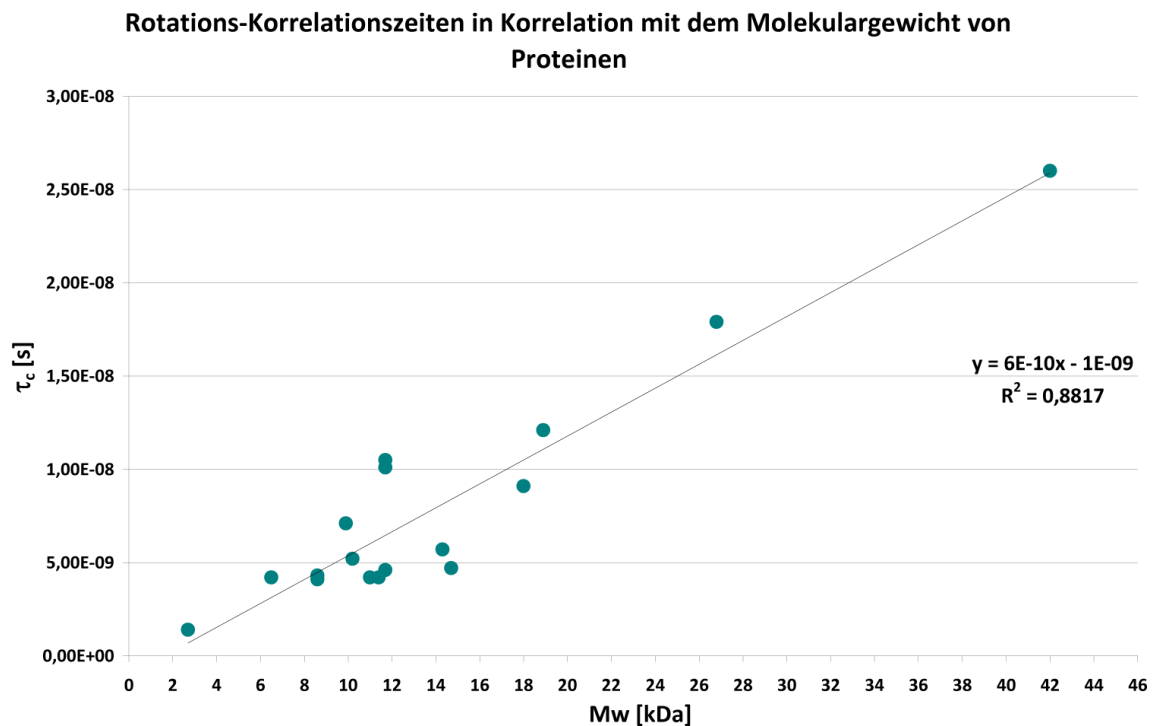


Abb. 3.26: Abhängigkeit der Rotations-Korrelationszeit τ_c vom Molekulargewicht. Die Daten wurden der Literatur entommen ▶Tab. 3.12. Die zu erwartenden Rotationskorrelationszeiten für die WW-Domäne (4 kDa), die PPIase-Domäne (14,3 kDa) sowie Pin1 sind farbig eingezeichnet.

4 Diskussion

Es sind zwei Strukturen von Pin1 bekannt, die mit verschiedenen Methoden aufgeklärt wurden und sich in ihrer Struktur unterscheiden. In der NMR-Struktur 1NMV interagieren die beiden Domänen nicht, in der Kristallstruktur 1PIN sind sie aneinandergelagert. Die Versuche dieser Arbeit sollten u.a. Aufschluss darüber geben, ob beide Zustände in vivo nebeneinander existieren können, und ob diese in einem dynamischen Gleichgewicht stehen.

4.1 Was ist die Ursache der Signalaufspaltungen in den ^{15}N -HSQC-Spektren?

In den ^{15}N -HSQC-Spektren von Pin1 sind aufspaltende Signale zu erkennen. Diese Aufspaltungen zeigen an, dass einige Aminosäuren in zwei Zuständen mit unterschiedlicher chemischer Umgebung vorliegen, die bei einer Temperatur von 3°C jeweils im Verhältnis von $\frac{60\%}{40\%}$ ($\frac{70\%}{30\%}$) stehen. Mit steigender Temperatur verstärken sich die Unterschiede in den Populationen auf bis zu $\frac{80\%}{20\%}$. Diese temperaturabhängige Veränderung der Populationen weist darauf hin, dass diese in einem dynamischen Gleichgewicht stehen könnten. Da zwei Konformationen von Pin1 bekannt sind (Domänen interagieren nicht=offen oder interagieren=geschlossen), ist es möglich, dass die beiden aufspaltenden Signalpeaks die zwei Konformationen beschreiben. Bei Vergleichsmessungen mit den Pin1-Konstrukten mit verkürztem Liner (*short*Pin1) und der WW-Domäne alleine (Pin1_{WW}), können keine temperaturabhängigen Aufspaltungen ►[Kap. 3.1.2](#) detektiert werden.

Die Anwesenheit der PPIase-Domäne und ein voll funktionfähiger (unverkürzter) Liner sind demnach für die Signalaufspaltung unabdingbar.

An dieser Stelle stellt sich die Frage, welche Population der offenen und welche der geschlossenen Konformation zugeordnet werden kann. Bayer ([Bayer et al., 2003](#)) postuliert bereits ein dynamisches Gleichgewicht zwischen beiden Konformationen und geht davon aus, dass dies auf der Seite der offenen Konformation liegt. In Bezug auf diese Quelle wird die in der Temperaturmessreihe stärker besetzte Population der offenen Konformation zugeschrieben (A-Peak). Der B-Peak zeigt die geschlossene Konformation an. Beide Populationen werden statistisch nach Boltzmann besetzt, so dass die offene und die geschlossene Form nebeneinander vorliegen. Berechnungen

des energetischen Unterschiedes zwischen beiden Populationen ergeben 2–3 KJ/mol, ein Wert, der der Bindungsstärke einer Wasserstoffbrücke in wässriger Umgebung entspricht. Die geschlossene Konformation würde durch die Wasserstoffbrücke gestärkt, aber die energetischen Einflüsse aus der Umgebung würden diese teilweise überwinden. ►Abb. 3.4 zeigt, dass bei sinkender Temperatur die geschlossene Konformation stärker populiert wird, als bei höheren Temperaturen.

Der Temperatureinfluss auf die Populationen kann auf den erhöhten Energieeintrag in das System bei höherer Temperatur erklärt werden. In der Kristallstruktur von Pin1 bilden die Aminosäuren T29 und G148 eine Wasserstoffbrücke zwischen den Domänen. Diese könnte eine entscheidende Rolle bei der Domäneninteraktion spielen.

4.2 Weist eine Kolaszenz auf zwei Zustände hin?

Die aufspaltenden Peaks laufen in den übereinandergelagerten 2D-Spektren der Temperaturmessreihe mit zunehmender Temperatur aufeinander zu, bis sie sich bei über 30°C überlagern. Aufspaltende Peaks, die bei höheren Temperaturen verschmelzen (Koaleszenz), sprechen für einen chemischen Austausch ►Kap. 2.1.2. Der Nachweis von Koaleszenz wäre ein weiteres Indiz für ein dynamisches Gleichgewicht zwischen beiden Zuständen. Aufspaltende Signale treten auf, wenn die Austauschrate zwischen zwei Populationen langsam ist, und diese daher als Signal im Spektrum getrennt voneinander detektiert werden können („slow exchange“). Bei Energieeintrag in das System durch Erhöhung der Temperatur kann das System in den „intermediate“ bzw. „fast exchange“ wechseln, so dass die Peaks nur noch teilweise, bzw. gar nicht mehr getrennt wahrgenommen werden können. Bevor der Koaleszenzpunkt erreicht wird, sollte die Linienbreite der Peaks mit zunehmender Temperatur ansteigen.

Mit Hilfe einer Linienformanalyse kann die Veränderung der Linienbreite bei verschiedenen Temperaturen untersucht werden. Prof. Andrzej Ejchart vom „Institute of Biochemistry and Biophysics“ in Warschau hat diese Linienformanalyse für uns durchgeführt, und ist zu dem Ergebnis gekommen, dass sich anhand der ineinanderlaufenden Signale nicht genau sagen lässt, ob es sich um ein Koaleszenzphänomen handelt. Es ist keine direkte Linienverbreiterung mit steigender Temperatur festzustellen. Auch die eigenen Ergebnisse, in denen die Signalbreite auf halber Höhe gegen die Temperatur aufgetragen wurden, bestätigen dies ►Abb. 6.2. Werden die Linienbreiten der aufspaltenden Peaks aber mit denen der nicht aufspaltenden Peaks verglichen, sind Unterschiede in Bezug auf den Verlauf der Linienbreiten in Abhängigkeit von der Temperatur festzustellen. Für die Peaks der nicht aufspaltenden Aminosäuren nimmt die Linienbreite tendenziell mit steigender Temperatur ab. Im Verhältnis

zu den nicht aufspaltenden Peaks, nimmt die Linienbreite der aufspaltenden Peaks demnach zu.

Doch auch wenn sich nicht mit Sicherheit nachweisen lässt, dass es sich um Koaleszenzphänomene handelt, zeigen die Aufspaltungen an, dass zwei Zustände existieren. Dass die Verhältnisse für sämtliche aufspaltende Peaks in der Temperaturmessreihe sich einheitlich in Bezug auf das Aufspalten und die Populationsverhältnisse verhalten, lässt darauf schließen, dass die Zustände als makroskopisch betrachtet werden können und nicht nur für die einzelnen (aufspaltenden) Resonanzen, sondern für das gesamte Protein Gültigkeit haben.

4.3 Wie stark ist die Wechselwirkung zwischen den Domänen?

Der Interaktionsbereich beider Domänen beträgt nur wenige nm² und ist zu klein, um die geschlossene Konformation von sich aus zu stabilisieren. Für eine schwache Wechselwirkung beider Domänen spricht, dass Bayer (Bayer et al., 2003) keine NOEs für Peaks zwischen beiden Domänen detektieren konnte. Für eine mögliche Detektion müssten die Domänen einige Millisekunden zusammen bleiben. In vitro kann also davon ausgegangen werden, dass die Interaktion der Domänen im niederen Millisekundenbereich bzw. darunter liegt.

Um die lokale Konzentration und die Wahrscheinlichkeit einer Domäneninteraktion zu erhöhen, besitzt Pin1 einen Linker. Dessen Bedeutung konnte ebenfalls von unserer Gruppe beschrieben werden. In einem Experiment wurde die WW-Domäne der im NMR-Röhrchen vorgelegten PPIase-Domäne zutitriert. Es wurde gezeigt, dass sich die ¹⁵N-HSQC-Spektren für Pin und für das 1:1-Gemisch von PPIase- und WW-Domäne unterscheiden. Dass sich die Spektren unterscheiden, kann nur der Fall sein, wenn beide Domänen in Pin1 interagieren, im 1:1-Gemisch jedoch nicht.

Eine Interaktion ist nur in Anwesenheit des Linkers sichtbar. Der Linker spielt also für die Domäneninteraktion eine entscheidende Rolle, wie auch meine Messungen zeigen. Die Variante *shortPin1* zeigt keine Anzeichen einer Domäneninteraktion, weder in Abhängigkeit von der Temperatur ▶Kap. 3.1.2 noch unter Zugabe des Liganden Peg ▶Kap. 3.2.2. Die Länge des Linkers ist spezifisch definiert und kontrolliert das gezielte Zusammenspiel beider Domänen. Ein verkürzter Linker wird in seiner Funktion eingeschränkt, und die Domänen können nicht mehr optimal miteinander interagieren, da die Interaktion sterisch gehindert ist.

Stellt man sich den Aufenthaltsraum beider Domänen als Kugel vor, innerhalb der eine gewisse Wahrscheinlichkeit für die Interaktion der beiden Domänen besteht, so

ist die Wahrscheinlichkeit umso größer, je kleiner das Volumen der Kugel ist. In diesem Beispiel verkleinert der Linker das Volumen auf maximal 20 Å und erhöht die Wahrscheinlichkeit einer Domäneninteraktion.

Um die Stärke der Domäneninteraktion näher zu beschreiben, müssten Dissoziationskonstanten für die Anlagerung beider Domänen bestimmt werden. Dafür müsste eine Domäne in niedriger, aber noch messbarer, Konzentration vorgelegt werden und die andere Domäne dieser in ausreichend hoher Konzentration zutitriert werden. In den HSQC-Spektren sollten bei einer Interaktion Verschiebungen sichtbar sein, über die sich der K_D dieser Interaktion messen ließe. Damit dieser K_D -Wert sich möglichst genau berechnen lässt, muss solange zutitriert werden, bis sich die Signale nicht mehr weiter verschieben. An dieser Stelle sollte eine Sättigung erreicht werden. Im Experiment von Bayer ([Bayer et al., 2003](#)) bei der Titration der Domänen bis zu einem Verhältnis von 1:1 zu keinen chemischen Verschiebungen gegenüber den Ausgangsspektren. Dies weist auf eine sehr schwache Wechselwirkung zwischen den Domänen hin. Weiter Hinweise darauf, dass beide Domänen interagieren, finden sich in der Literatur bei ([Ranganathan et al., 1997](#); [Jacobs et al., 2003](#); [Zhang et al., 2007](#)).

4.4 Können Liganden das Gleichgewicht zwischen beiden Konformationen beeinflussen?

Experimente von Jacobs ([Jacobs et al., 2003](#)) liefern Hinweise darauf, dass mit geeigneten Liganden die Domäneninteraktion beeinflusst werden kann. In ihrem Versuchsaufbau können sie über R2/R1-Messungen ($\Delta T1/T2$) nachweisen, dass die gemittelten und zunächst unterschiedlichen Relaxationszeiten beider Domänen auf sehr ähnliche Werte ansteigen, wenn Substrate zugegeben werden. Je besser die Liganden binden, desto mehr gleichen sich die Messwerte für beide Domänen an. Dies spricht für eine Domäneninteraktion, die umso stärker ausgeprägt ist, je besser ein Ligand bindet.

Das von Ranganathan als Kristallisationshilfe verwendete Peg400 induziert Aufspaltungen im HSQC-Spektrum für Resonanzen von Aminosäuren, die im Bindungsinterface situiert sind und eine hydrophobe Oberfläche ausbilden ▶[Tab. 6.1](#) sowie für Aminosäuren, die in direkter Umgebung dieses Bereichs liegen (W11, N26, T29, A31, E35). Dieser wird in der Veröffentlichung der Kristallstruktur ([Ranganathan et al., 1997](#)) als „hydrophobic clash“ (hydrophober Spalt) beschrieben (bestehend aus den Aminosäuren S16, Y23, S32 und W34).

Es wird daher vermutet, dass Peg Einfluss auf die Domäneninteraktion von Pin1

haben könnte.

4.4.1 Warum lässt sich die Verstärkung der Domäneninteraktion durch Peg nicht über die Relaxationszeiten beschreiben?

Durch Zugabe von Peg konnten Aufspaltungen von Peaks induziert werden ▶[Kap. 3.2.1](#), deren Populationen sich mit zunehmender Peg-Konzentration von ca. $\frac{60\%}{40\%}$ auf $\frac{40\%}{60\%}$ (bei 3% Peg) umkehren. Für die Relaxationsmessungen wären daher für beide Domänen in Anwesenheit von 2% Peg Zunahmen für T1/T2 und die daraus errechnete Rotationskorrelationszeit zu erwarten gewesen. Als Nachweis für eine Interaktion müsste sich nach Peg-Zugabe für beide Domänen der gleiche Wert für τ_c ergeben (der wiederum annähernd¹ der Summe der Werte für die einzelnen Domänen entsprechen müsste (≈ 11 ns)). Die Zunahme für die kleinere und leichtere WW-Domäne müsste demnach stärker ausgeprägt sein, als für die PPlase-Domäne ▶[Abb. 4.1](#). Die zu erwartenden Rotationskorrelationszeiten für die einzelnen Domänen und Pin1 wurden über die Geradengleichung aus ▶[Abb. 4.2](#) berechnet.

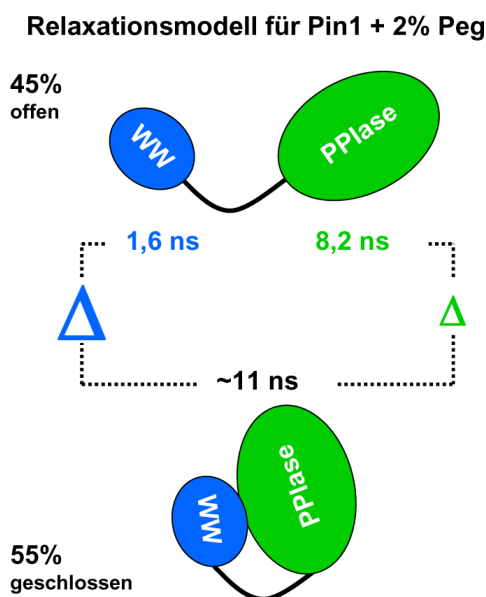


Abb. 4.1: Relaxationsmodell für Pin1 unter Einfluss von Peg400. In Anwesenheit von 2% Peg400 liegt Pin1 ca. 55% in geschlossener Konformation vor (vergl. ▶[Abb. 3.11](#)). Die zu erwartenden Rotationskorrelationszeiten wurden über die Geradengleichung in ▶[Abb. 4.2](#) berechnet.

¹annähernd, da die Ergebnisse durch die Dynamik von Pin1 um einen unbekannten Faktor f_1 abgeschwächt werden.

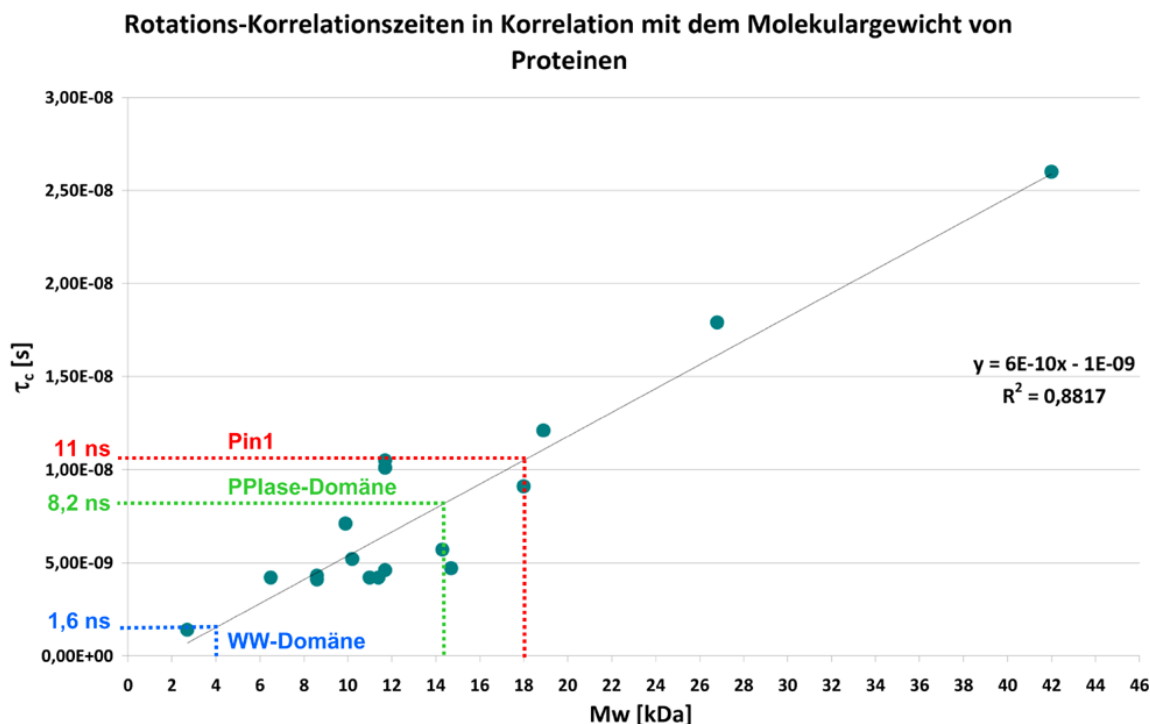


Abb. 4.2: Abhängigkeit der Rotations-Korrelationszeit τ_c vom Molekulargewicht. Die Daten wurden der Literatur entnommen ▶Tab. 3.12. Die zu erwartenden Rotations-korrelationszeiten für die WW-Domäne (4 kDa), die PPIase-Domäne (14,3 kDa) sowie Pin1 sind farbig eingezeichnet.

In diesem Modell muss mit berücksichtigt werden, dass Pin1 bei der Messtemperatur von 28°C in zwei Zuständen vorliegt (70% offen und 30% geschlossen) und unter Einfluss von 2% Peg400 zu ca. 55% in der geschlossenen Konformation ▶Abb. 3.11. Über die Geradengleichung aus ▶Abb. 3.26 lassen sich die zu erwartenden Werte für τ_c für die WW- und die PPIase-Domäne ausrechnen. Man erhält $\tau_c(\text{WW}_{\text{calc}})=1,6$ ns für die WW-Domäne (4 kDa), $\tau_c(\text{PPIase}_{\text{calc}})=8,2$ für die PPIase-Domäne (14,3 kDa) und 11 ns für das gesamte Protein (18,3 kDa). $\tau_c(\text{WW}_{\text{calc}})$ und $\tau_c(\text{PPIase}_{\text{calc}})$ werden im Anschluss mit den berechneten Werten aus den Relaxationszeiten $\tau_c(\text{WW}_{\text{obs}})$ und $\tau_c(\text{PPIase}_{\text{obs}})$ verglichen.

In den folgenden Gleichungen wird f_1 als Faktor eingefügt, um die nicht näher zu charakterisierende Dynamik der Domäneninteraktion mit zu berücksichtigen. Für die Messung ohne Peg ist nach

$$\tau_c(\text{WW}_{\text{calc}}) = f_1(0,70 \times [\tau_c(\text{WW}_u)] + [0,30 \times [\tau_c(\text{WW}_b)]])$$

ein Wert von

$$f_1([0,70 \times 1,6] + [0,30 \times 11]) \text{ ns} = 4,4 \text{ ns} \times f_1$$

zu erwarten ($\tau_c(\text{WW}_{\text{obs}})=9,3$ ns), und mit 2% Peg aufgrund der veränderten Populationen

$$f_1([0, 45 \times 1, 6] + [0, 55 \times 11]) \text{ ns} = 6,8 \text{ ns} \times f_1$$

($\tau_c(\text{WW}_{\text{obs}}^{\text{Peg}})=9,3$ ns). Für die PPIase-Domäne berechnen sich die Werte nach dem selben Schema. Man erhält mit

$$\tau_c(\text{PPIase}_{\text{calc}}) = f_1(0, 70 \times [\tau_c(\text{PPIase}_{\text{u}})] + [0, 30 \times [\tau_c(\text{PPIase}_{\text{b}})])$$

$$f_1([0, 70 \times 8] + [0, 30 \times 11]) \text{ ns} = 8,9 \text{ ns} \times f_1$$

ohne Peg ($\tau_c(\text{PPIase}_{\text{obs}})=10,0$ ns) und

$$f_1([0, 45 \times 8] + [0, 55 \times 11]) \text{ ns} = 9,7 \text{ ns} \times f_1$$

mit Peg ($\tau_c(\text{WW}_{\text{obs}}^{\text{Peg}})=11$ ns).

Die Ergebnisse zeigen, dass $\tau_c(\text{WW}_{\text{calc}}) \neq \tau_c(\text{WW}_{\text{obs}})$ ist. Die Ergebnisse sind in [Tab. 4.1](#) zusammengefasst.

Tab. 4.1: Vergleich der theoretischen $\tau_c(\text{calc})$ und der gemessenen Werte $\tau_c(\text{obs})$ der Rotationskorrelationszeiten.

Domäne	ohne Peg		mit 2% Peg	
	$\tau_c(\text{calc})$ [ns]	$\tau_c(\text{obs})$ [ns]	$\tau_c(\text{calc})$ [ns]	$\tau_c(\text{obs})$ [ns]
WW	4,4	9,3	6,8	9,3
PPIase	8,9	10,0	9,7	11,0

Die gemessenen Unterschiede zwischen den gemessenen Werten unter Einfluss von 2% Peg und ohne Peg weichen jeweils kaum voneinander ab. Der Wert für die WW-Domäne mit 9,3 ns bleibt sogar konstant, der Wert für τ_c der PPIase-Domäne steigt um 1 ns auf 11 ns. Der Vergleich mit den zu erwartenden Werten für τ_c zeigt starke Abweichungen der Messergebnisse vom Modell für die Messungen ohne Peg. Da die Werte für die Messungen mit Peg sehr nah an denen der theoretisch berechneten Werte liegt, kann davon ausgegangen werden, dass die Domänen von Pin1 nicht wirklich frei vorliegen und sich auch ohne Ligand beeinflussen. Wäre f_1 bekannt und würde es mit einberechnet, könnte sich dieser Unterschied noch ausgleichen. Dass die gemessenen Werte für die Domänen ohne Peg den theoretischen Werten mit Peg vergleichbar sind, könnte auf die Anwesenheit des Linkers zurückzuführen sein, der beide Domänen verbindet. In diesem Fall ist das Modell, das freie Domänen zwingend voraussetzt, für

die Beschreibung der Pin-Peg-Interaktion nicht anwendbar. Eine Bestätigung für die Verstärkung der Domäneninteraktion durch Peg ist auf diesem Wege nicht möglich. Leichte Abweichungen in den Ergebnissen können sich außerdem aus der Natur der Relaxationsspektren ergeben. Die Auswertung wird an dieser Stelle vor allem durch die abnehmende Signalintensität bei zunehmenden T1- und T2-Zeiten erschwert. Sinkt die Intensität in den Bereich des Spektrenrauschens, ist es schwer bis unmöglich, die Peaks richtig zuzuordnen. Daher können auch nicht für alle Aminosäuren über die gesamte Messreihe Intensitäten ausgelesen und gefittet werden. Dennoch ist es für diese Messreihe gelungen, 30 von 39 möglichen Werten für die WW-Domäne zu fitten (27 unter Einfluss von Peg), und jeweils 85 von 114 für die PPIase-Domäne. Dies entspricht 76% (69% mit Peg) für die WW-Domäne und 75% für die PPIase-Domäne. Die Werte basieren auf der Auswertung von $\frac{3}{4}$ aller Werte und können als aussagekräftig angesehen werden.

4.4.2 Über die Aufspaltungen lässt sich der Einfluss des schwachen Binders Peg auf die Domäneninteraktion beschreiben

Es spalten in der Peg-Messreihe ausschließlich Peaks der WW-Domäne mit zunehmender Peg-Konzentration schrittweise auf, während sich gleichzeitig ihre Populationen umkehren ►[Kap. 3.2.1.2](#), ►[Abb. 3.6](#). Die Tatsache, dass dies für alle aufspaltenden Peaks gilt, zeigt, dass die Populationsumkehr nicht durch einen lokal begrenzten Effekt hervorgerufen wird.

Wenn Peg alleine für die Aufspaltung verantwortlich wäre, müssten diese auch in den beiden Vergleichsmessungen mit der WW-Domäne und mit verkürztem Linker zu finden sein. Das ist jedoch in beiden Versuchen nicht der Fall.

Daraus kann man schließen, dass die Aufspaltungen durch Peg induziert werden, aber nicht allein auf die Anwesenheit von Peg zurückzuführen sind. Eine möglich Erklärung wäre, dass Peg sich, wie auch in der Kristallstruktur, zwischen den Domänen anlagert, und durch seine Anwesenheit die Domäneninteraktion verstärkt. Für eine Anlagerung an dieser Position sprechen die aufspaltenden Peaks, die in dieser Region lokalisiert sind ►[Abb. 6.1](#). Für die Induktion einer Domäneninteraktion spricht die Veränderung der Populationsverhältnisse in Richtung des Peaks, der in Abwesenheit des Liganden schwächer populierte ist.

Wenn der stärker populierte Peak (A-Peak) der offenen Konformation zugeschrieben wird und durch Zugabe von Peg eine Umkehr der Populationen stattfindet, bedeutet dies, dass die geschlossene Konformation energetisch stabilisiert wird. Mit dieser

Annahme lässt sich auch erklären, warum Pin1 mit RSA unter Einfluss von 40% Peg (v:v) in geschlossener Konformation aufgeklärt wurde, und mit NMR (ohne Peg) in offener.

4.4.3 Wie stark bindet Peg an Pin1?

Die Anlagerung des Liganden zeigt sich anhand der Verschiebungen der Resonanzen in den HSQC-Spektren der Peg-Messreihe, aus denen die K_D -Werte berechnet wurden. Die Bindung des Liganden an das Protein liegt im millimolaren Bereich und ist relativ schwach bezogen auf spezifische Substratbindungen, die meist im mikro- bzw. nanomolaren Bereich liegen. Sie ist damit eher unspezifisch, reicht aber aus, um messbare Effekte hervorzurufen.

Tab. 4.2: Vergleich der K_D -Werte für die Bindung von Peg an die freie WW-Domäne und an die WW-Domäne in Pin1 (Pin1_{fl}). Die Aminosäuren sind der Reihenfolge ihrer Sequenz nach geordnet.

Aminosäure	K_D [mM]		Verhältnis von $\frac{\text{Pin1}_{fl}}{\text{Pin}_{WW}}$
	Pin1 _{fl}	Pin _{WW}	
W11ε	64	52	1,2
V22	246	25	10
T29	3447	267	13
A31	19	222	0,1
S32	87	9	10
Q33	177	10	19
W34	215	14	15
W34ε	407	16	25
E35	139	17	8

Der Vergleich der auf die Aminosäuren bezogenen K_D -Werte für Peg gebunden an die freie WW-Domäne (Pin_{WW}) mit denen von Pin1_{fl} ist im Verhältnis höher, als für die freie WW-Domäne ▶Tab. 4.2. In der rechten Zeile der Tabelle sind die K_D -Werte ins Verhältnis gesetzt. Die Werte für die WW-Domäne liegen im mit Ausnahme von A31 unter denen von Pin1_{fl}. Die Effekte des Liganden auf die freie WW-Domäne sind demnach größer, als auf die in Pin1 gebundene.

Der Wert für T29 für Pin1_{fl} liegt mit 3447 mM um mehr als das achtfache höher als der nächsthöhere Wert von W34ε. Es könnte sein, dass hier der Anteil des Terms für die Strukturveränderungen ▶Gl. 2.7, der in die Shifts mit einfließt, höher ist, als bei denen der anderen Aminosäuren. In diesem Fall würde W34ε eine stärkere Strukturveränderung erfahren als die anderen Aminosäuren.

Über den Vergleich der K_D -Werte der A- und B-Peaks für die Peg-Interaktion mit Pin1 ▶Tab. 3.5 kann keine eindeutige Aussage darüber gemacht werden, ob evtl. eine konformationsbedingte Affinität vorliegt. Die Fits für Y23 ($\Delta K_D = 32\text{mM}$) und A31 ($\Delta K_D = 23\text{mM}$) ergeben niedrigere K_D -Werte für die B-Peaks und weisen auf eine stärkere Wechselwirkung mit Peg in der geschlossenen Konformation hin. Für W11ε ($\Delta K_D = 10\text{mM}$) und E35 ($\Delta K_D = 107\text{mM}$) sind die Fitergebnisse entgegengesetzt und für die B-Peaks niedriger.

4.5 Ändert sich die Struktur der WW-Domäne in Anwesenheit der PPIase-Domäne oder von Liganden?

Zur Überprüfung, ob sich die Struktur der WW-Domäne in offener und geschlossener Konformation ändert, wenn Liganden gebunden sind, und ob sich die freie WW-Domäne von der an eine PPIase-Domäne gebundene in ihrer Struktur unterscheidet, wird nachstehend ein Vergleich verschiedener Strukturdatenbankeinträge angeführt. Der Vergleich verschiedener WW-Domänen von Pin-Varianten zeigt, dass deren Struktur im Bereich der Faltblätter stabil bleibt, auch wenn Liganden angelagert werden ▶Abb. 4.3. Das gilt sowohl für WW-Domänen, die ohne PPIase-Domäne untersucht wurden, als auch für WW-Domänen, die im kompletten Protein betrachtet wurden ▶Tab. 4.3.

Tab. 4.3: Vergleich verschiedener Pin1-WW-Domänen mit und ohne gebundene Liganden. Die Strukturen 1I6C und 1I8G sind ohne PPIase-Domäne untersucht worden, die anderen sind Auszüge aus der Gesamtstruktur. An die Strukturen 1PIN, 1F8A, 1I8G und 2Q5A sind die in der Tabelle aufgelisteten Liganden gebunden, die der Übersichtlichkeit wegen aus der Grafik entnommen wurden.

Jahr	Struktur	Methode	Referenzen	Liganden
1997	1PIN	X-Ray	Ranganathan et al., 1997	Peg400 + Peptid ($\text{H}_3 \text{N}^+ \text{-Ala-Pro-COO}^-$)
2000	1F8A	X-Ray	Verdecia et al., 2000	Peptid (Y-pSer-Pro-Thr-pSer)
2001	1I6C	NMR	Wintjens et al., 2001	Ohne Ligand
2001	1I8G	NMR	Wintjens et al., 2001	Peptid (Glu-Gln-Pro-Leu-pThr-Pro-Val-Thr-Asp-Leu ⁴)
2003	1NMV	NMR	Bayer et al., 2003	Ohne Ligand
2007	2Q5A	X-Ray	Zhang et al., 2007	L-Peptid (Ac-Phe1-L-pThr2-Pip3-Nal4(naphthylalanine)-Gln5-NH ₂) ⁵)

Die Struktur der WW-Domäne ist demnach in ihrer Form so stabil, dass diese sich durch Anlagerung von Liganden und auch die Anwesenheit der PPIase-Domäne und des Linkers nicht stark ändert. Diese Tatsache bestärkt die Annahme des Linkers als Mittler einer Domäneninteraktion, die wiederum für die in den Messreihen detektierten Aufspaltungen verantwortlich ist und diese nicht etwa durch intramolekulare Strukturveränderungen innerhalb der WW-Domäne zustande kommen.

⁴abgeleitet von der Cdc25-Phosphatase von *Xenopus laevis*

⁵das L-Peptid ist der zyklischen Konformation von FK506 und Rapamycin nachempfunden

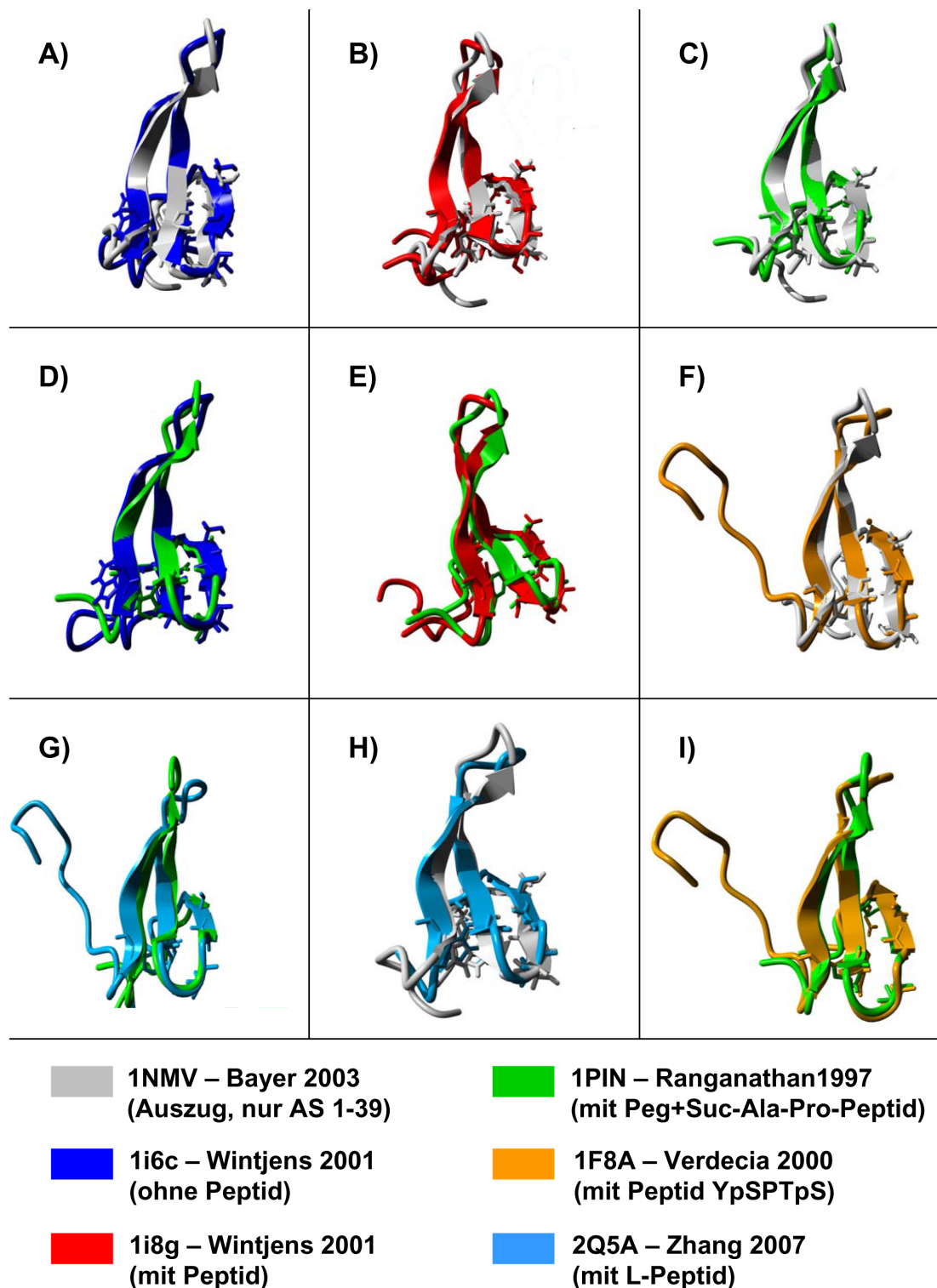


Abb. 4.3: Es werden Strukturen verschiedener Pin1-WW-Domänen mit und ohne gebundene Liganden untereinander verglichen. Weitere Details zu den Strukturen können ▶Tab. 4.3 entnommen werden. Es ist zu erkennen, dass die WW-Domänen in ihrer Form so stabil sind, dass sie sich auch nach Anlagerung verschiedener Liganden kaum verändern.

4.6 Wie bildet sich zeitlich das Interface aus?

Die Reihenfolge, in der sich die Populationsumkehr vollzieht, könnte Hinweise auf den Ablauf der Domäneninteraktion geben (►Tab. 3.7 und ►Abb. 3.11). T29, das in einer *Loop*-Region zwischen β 2- und β 3-Faltblatt situiert ist, und in der geschlossenen Struktur 1PIN eine H-Brücke zu G148 in der PPIase-Domäne ausbildet, erfährt bei der niedrigsten Konzentration (0,7%) eine Zustandsänderung. Es folgen nahe beieinander im Bereich einer Peg-Konzentration von 1,4-1,7% W11 ϵ im β 1-Faltblatt, N26 im β 2-Faltblatt, A31 und S32 im β 2-Faltblatt. E35 folgt erst bei der vergleichsweise hohen Peg-Konzentration von 2,6%. Alle Signale der Aminosäuren der Peg-Bindungsseite der WW-Domäne von 1PIN spalten auf und zeigen eine durch Peg induzierte und von der Konzentration abhängige Veränderung, die Umkehr eines Zustandes A in B. Die Aminosäure E35 liegt außerhalb dieser Bindungsregion, am Rand der WW-Domäne, und erfährt erst bei höherer Konzentration eine Umkehr der Zustände.

Als Modell für eine solche Interaktion wird eine reversible² Konformationsänderung der offenen (1NMV) in die geschlossene Konformation (1PIN) von Pin1 vorgeschlagen. Auszüge aus einem mit der Software Yasara erstellten Morphings der offenen in die geschlossene Konformation sind in ►Abb. 4.4 dargestellt. Die Berechnung der Strukturumwandlung erfolgte mit der Software Yasara. Yasara wandelt eine Struktur in eine andere um, indem es virtuelle Kräfte simuliert, die die Aminosäurereste der Ausgangsstruktur auf die Koordinaten der Zielstruktur verschieben. Auf Reste, die nur in der Ausgangs- aber nicht in der Zielstruktur vorhanden sind, werden keine Kräfte ausgeübt³. Dies gilt in der hier präsentierten Berechnung für die Aminosäuren 40-44 in der Linkerregion sowie 1-5, die in der Kristallstruktur nicht vorhanden sind. Die WW-Domäne nähert sich im berechneten Modell der PPIase-Domäne an, wobei sich bis kurz vor der Anlagerung nur der Linker verformt, die Domänen an sich ihre Ausgangsstruktur aber behalten. Im ersten Schritt der Anlagerung nähert sich die WW-Domäne mit Aminosäure T29 am unteren Ende des β 3-Faltblatts Aminosäure G148 in der PPIase-Domäne an. Anschließend lagert sich die anderen Aminosäuren der WW-Domäne an. Dabei werden der Bereich um die Aminosäure E35 und der in der Sequenz folgende Linker weiter nach außen gedrängt. Dieses Modell deckt sich mit den Auswertungen der Populationsumkehr der Peg-Messreihe.

Um das hydrophobe Interface zwischen den Domänen in der Art auszubilden, wie sie die Kristallstruktur zeigt, ist anscheinend zunächst die Ausbildung der Wasserstoffbrücke notwendig, um die nötigen Voraussetzungen der weiteren Bindung der

²reversibel, da auch die Veränderungen der aufspaltenden Signale in der Temperaturmessreihe reversibel sind

³Quelle: Yasara-Dokumentation, Experiment.html, „Experiment Morphing“

WW-Domäne zu gewährleisten.

In der Peg-Messreihe liegen die Konzentrationen von Peg, bei denen ein $\frac{50\%}{50\%}$ -Gleichgewicht erreicht wird, im Bereich von 1,4–1,7% Peg, also sehr nah beieinander, was bedeutet, dass diese Strukturelemente ihre Veränderung unter fast gleichen Peg-Bedingungen erfahren. Nur der Wert für die Aminosäure E35 liegt mit 2,6% etwas höher. Dieses Ergebnis decken sich mit dem berechneten Modell der Strukturumwandlung bei der Anlagerung. Aminosäure E35 wird erst direkt vor der maximalen Anlagerung in sein entgültige Position in der geschlossenen Konformation gedrängt. In Bezug auf diese Ergebnisse lassen sich auch die einheitlichen Zunahmen der Freien Enthalpien in der Peg-Messreihe in Abhängigkeit von der Konzentration des Titranten erklären. Peg dient als Vermittler für die Domäneninteraktion.

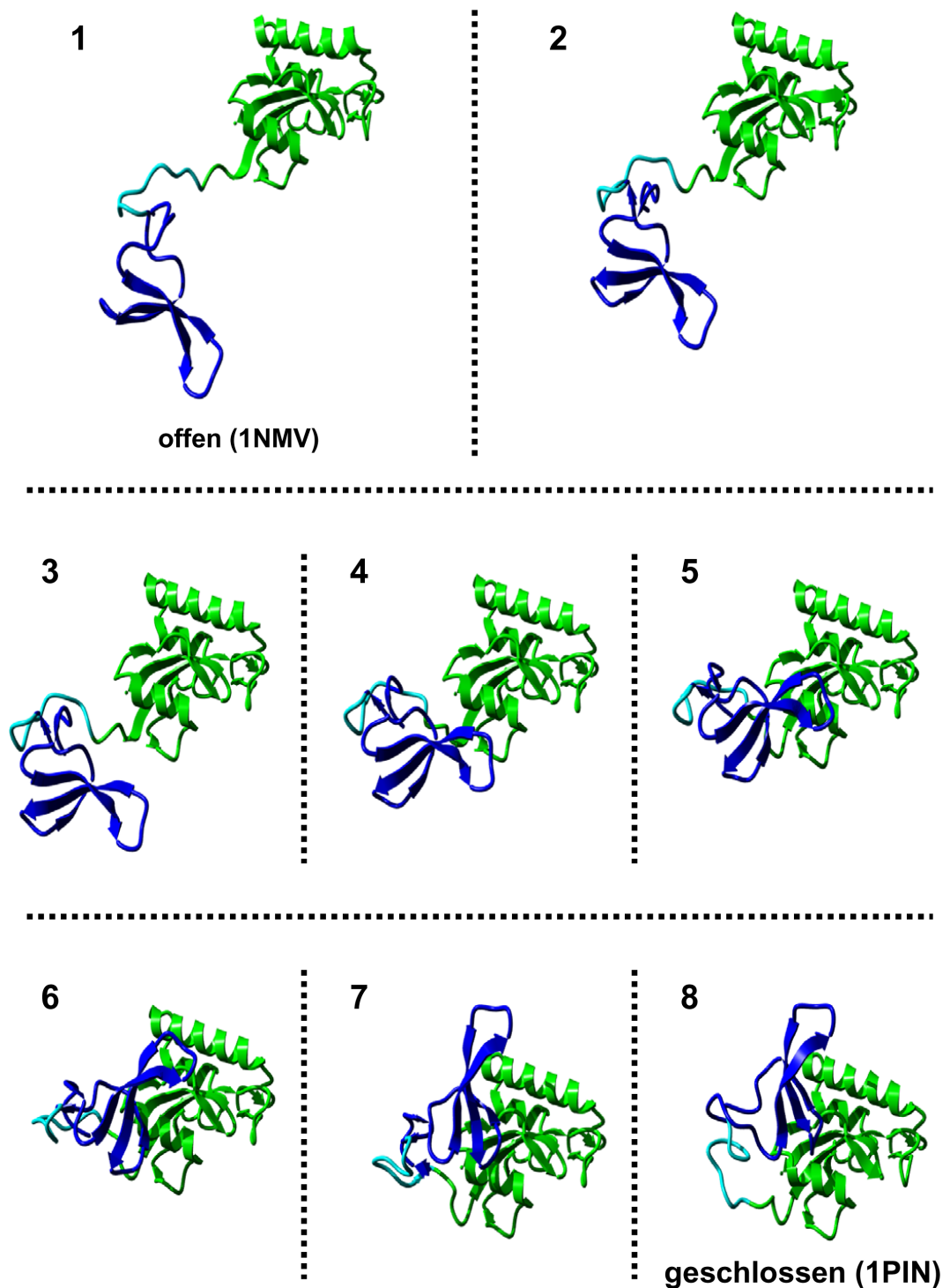


Abb. 4.4: Auszug der Morphing-Berechnung mit Yasara. Es wurden die Strukturen 1NMV und 1PIN ineinander umgewandelt. Über nachstehenden Link kann die Sequenz in der PDF-Version dieser Arbeit als Film angeschaut werden ►[Abspielen](#).

4.7 Unterscheiden sich die offene und die geschlossene Konformation in ihrer Funktion?

Die Titration mit dem Peptid Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA sollte Aufschluß über die funktionelle Relevanz der zwei Zustände von Pin1 geben. Für das Peptid ist eine Populationsumkehr nicht nachweisbar, obwohl es mit mikromolarem K_D Bereich besser bindet, als Peg. Auffällig sind in dieser Messreihe die unterschiedlichen Shift-Amplituden und K_D -Werte für die A- (offene Konformation) und B-Peaks (geschlossene Konformation) aufspaltender Signale der WW-Domäne. Im Vergleich der chemischen Verschiebungen ergeben sich für die WW-Domäne höhere Amplituden für die Distanzen der B-Peaks als für die A-Peaks ▶Abb. 3.19. Die K_D -Werte der B-Peaks der WW-Domäne liegen niedriger ▶Abb. 3.20. Beide Ergebnisse weisen darauf hin, dass die B-Konformation, also die geschlossene Konformation von Pin1, das Peptid doppelt so gut bindet, wie die offene. Dies könnte zu einem möglichen Unterschied in der Effizienz in vivo führen. Die Aufspaltungen werden auch in dieser Messreihe nur für Peaks in der WW-Domäne beobachtet. Der durch das Peptid induzierte Effekt wirkt sich demnach stärker auf die WW-Domäne aus.

4.8 Neue Screening-Methode

Abgeleitet aus den Ergebnissen dieser Arbeit wird ein neues Modell für Screening-Methoden vorgeschlagen. Die Untersuchung der Aufspaltung von Peaks in Abhängigkeit von Liganden ermöglicht für Pin1 die Suche nach weiteren Liganden. Es können über die Beschreibung der Populationen der Peaks direkt Aussagen darüber getroffen werden, ob die Domäneninteraktion beeinträchtigt wird. Über die Verschiebungen lassen sich zudem auf bekanntem Wege K_D -Werte bestimmen⁴. Darüber hinaus dürfte dieses Modell auf alle anderen Proteine anwendbar sein, deren Domäneninteraktion durch Liganden beeinflusst werden kann und für die zwei Zustände im NMR-Spektrum angezeigt werden. Ist die Domäneninteraktion auch für die Funktion dieser Proteine maßgeblich, lassen sich auf diesem Wege potentielle Inhibitoren oder Aktivatoren finden, die neue Ansätze für die Suche medizinische Forschung bieten. Die Aufnahme eines einzelnen Spektrums im NMR dauert ca. 40 Minuten. Auf diese Weise wird die Untersuchung des Einflusses eines Liganden (inklusive Auswertung) an einem Tag ermöglicht. Das ist sehr schnell, verglichen mit den üblichen T1/T2-Messungen, deren Detektion und Auswertung ca. eine Woche in Anspruch nimmt und

⁴es handelt sich um mikroskopische K_D -Werte, s. Seite 41

deren Spektren nicht so sensitiv sind wie die eines einfachen ^{15}N -HSQCs.

5 Ausblick

5.1 Neue Ansätze zur Untersuchung der Domäneninteraktion

Zur näheren Betrachtung der Domäneninteraktion und zum Nachweis, dass Peg diese beeinflusst, wird vorgeschlagen, eine Pin1-Probe mit einem gyromagnetischen Spinlabel (PROXYL) zu versehen. Das ungepaarte Elektron des Sauerstoffradikals kann mit Protonen die sich in einem Bereich von 20–25 Å vom Radikal befinden koppeln, ähnlich wie diese beim NOE untereinander koppeln ([Gillespie & Shortle, 1997](#)). Dadurch stört es das Relaxationsverhalten der Protonen. Im ^{15}N -HSQC werden dann die Intensitäten der Peaks, denen sich das Label nähert, abnehmen oder/oder sich verschieben, und solche, von denen es sich entfernt, zunehmen. Als Ankerpunkt im Protein wird ein Cystein benötigt, über das PROXYL kovalent gebunden werden kann. Als strategisch günstig erweist sich dafür die Position der Aminosäure S18, da sie am oberen Ende der WW-Domäne liegt und das Label dort in der offenen Konformation keinen Einfluss auf die PPIase-Domäne, und nur verglichen mit anderen Positionen einen vergleichsweise geringen Einfluss auf die WW-Domäne selbst haben dürfte. Findet eine Domäneninteraktion statt, nähert sich das Label der $\alpha 1$ -Helix der PPIase-Domäne und wird die Intensität der Peaks im Einflussbereich abschwächen. Wenn Peg zu einer Verstärkung der Domäneninteraktion führt, wird dieser Einfluss zunehmen, da die Verweildauer des Labels in der Nähe der Helix zunimmt. Um eine Bindung des Labels an die WW-Domäne zu ermöglichen, die im Wildtyp von Pin1 kein Cystein enthält, und die zwei anderen Bindungsmöglichkeiten in der PPIase-Domäne (Cys58/113) auszuschließen, wurden bereits folgende Punktmutationen mittels Quickchange durchgeführt: Ser18Cys, Cys58Ala, Cys113Ala.

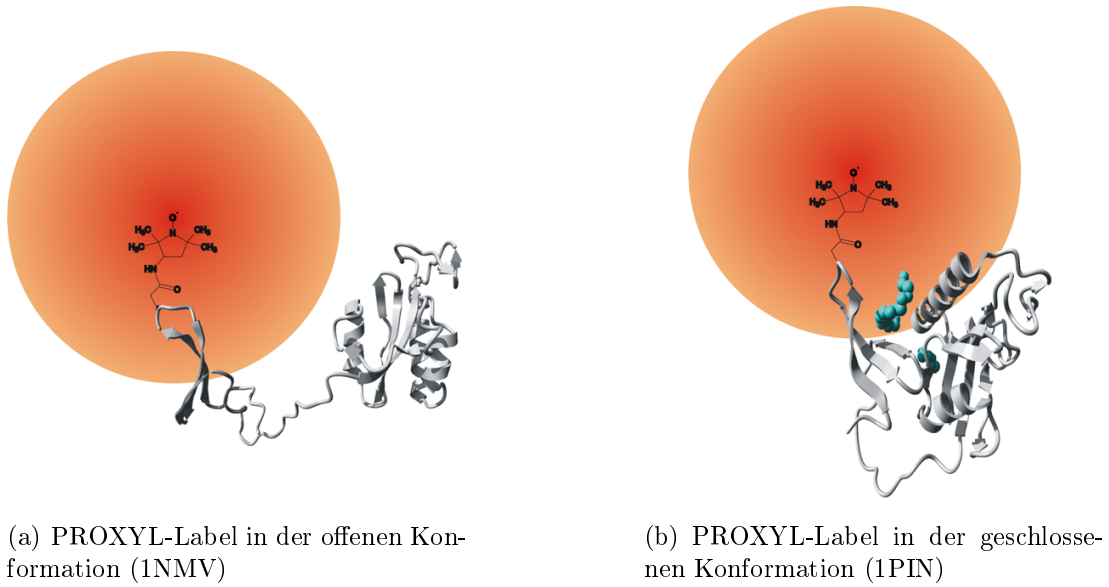


Abb. 5.1: Schematische Darstellung der Funktion des Spin-Labels

6 Zusammenfassung

In der Kristallstruktur (1PIN) der Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase Pin1 ([Ranganathan et al., 1997](#)) wechselwirken die beiden Domänen des Proteins (WW- und PPIase-Domäne) über ein gemeinsames Interface miteinander. Zwischen den Domänen ist ein niedermolekulares Polyethylenglykol-Molekül (Peg400) gebunden. NMR-Spektroskopische Untersuchungen hatten nahe gelegt, dass diese Wechselwirkung der beiden Domänen in Lösung dynamisch betrachtet werden muss und zwei Konformationen vorliegen sollten, die als „offen“ (Domänen interagieren nicht) und „geschlossen“ (Domäneninteraktion ist vorhanden) bezeichnet werden ([Bayer et al., 2003](#); [Jacobs et al., 2003](#)).

In dieser Arbeit wurde die Interaktion der beiden Domänen mit Hilfe der NMR-Spektroskopie untersucht. In ^{15}N -HSQC-Spektren von Pin1 lassen sich Resonanzen erkennen, die mit abnehmender Temperatur aufspalten und mit steigender Temperatur aufeinander zu laufen. Diese aufspaltenden Signale konnten Aminosäuren der WW-Domäne zugeordnet werden, die im Bindungsinterface beider Domänen liegen. Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe legten nahe, dass die Aufspaltungen ihre Ursache in einer Domäneninteraktion haben könnten. Aus der Tatsache, dass sich die Signalintensitäten (Populationen beider Zustände) mit zunehmender Temperatur ändern und dieser Vorgang reversibel ist, lässt sich ein dynamisches Gleichgewicht zwischen den im HSQC beobachteten Zuständen ableiten, so wie es auch von Bayer und Jacobs für die offene und geschlossene Konformationen von Pin1 postuliert wurde. Danach würden die beiden aus dem aufspaltenden Signal resultierenden Peaks repräsentativ für die beiden Konformationen stehen. Ist dem so, sollte das Gleichgewicht bei Zugabe eines Liganden, der die Domäneninteraktion verstärkt, auf die Seite der geschlossenen Konformation verschoben werden können.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Peg400 die Domäneninteraktion genau auf diese Weise beeinflussen kann. Eine Zugabe von Peg400 zu einer Lösung von Pin1 bewirkt eine Verstärkung der Aufspaltungen in den HSQC-Spektren und eine Veränderung der Signalstärken der beiden einzelnen Peaks (Veränderung der Population). Peg hat demnach einen Einfluss auf das Gleichgewicht, indem es die Population der geschlossenen Konformation erhöht und die der offenen vermindert. Die freie WW-Domäne (Pin1_{WW}) und eine Pin1 Variante mit einem verkürzten Linker (*shortPin1*) induzieren keine Aufspaltungen. In beiden Konstrukten ist die Domäneninteraktion nicht möglich oder eingeschränkt. Aus den Versuchen wird deutlich, dass sowohl die Anwesenheit beider Domänen als auch die des vollständigen Linkers für das Auftreten

von Aufspaltungen im ^{15}N -HSQC notwendig sind.

Aus ^{15}N -HSQC Spektren konnten über eine Titrationsreihe unter Zugabe des Modellsubstrats Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA Dissoziationskonstanten für die geschlossene und offene Konformation bestimmt werden. Die gemittelten K_D -Werte zeigen, dass die geschlossene Konformation das Peptid zweimal so stark bindet, wie die offene. Eine mögliche funktionelle Relevanz beider Konformationen könnte daher in der unterschiedlichen Bindung von Substraten und einer nachfolgenden unterschiedlichen katalytischen Aktivität liegen. Wozu dies in vivo nützlich sein könnte, bleibt spekulativ und Bedarf neuer zellulärer Studien.

Die vorliegende Arbeit bietet einen Ansatz für eine schnelle Screening-Methode um Aktivatoren oder Inhibitoren der Domäneninteraktion von Zwei- und Multidomänenproteinen mit Hilfe von ^{15}N -HSQC-Spektren zu untersuchen.

Literaturverzeichnis

- Atchison, F., Capel, B. & Means, A. (2003). *Development* 130, 3579–3586.
- Ayala, G., Wang, D., Wulf, G., Frolov, A., Li, R., Sowadski, J., Wheeler, T. M., Lu, K. P. & Bao, L. (2003). *Cancer Res* 63, 6244–6251.
- Ayed, A., Mulder, F. A., Yi, G. S., Lu, Y., Kay, L. E. & Arrowsmith, C. H. (2001). *Nat Struct Biol* 8, 756–760.
- Bayer, E., Goettsch, S., Mueller, J., Griewel, B., Guiberman, E., Mayr, L. & Bayer, P. (2003). *Journal of Biological Chemistry* 278, 26183–26193.
- Brandts, J., Halvorson, H. & Brennan, M. (1975). *Biochemistry* 14, 4953–4963.
- Braun, M., de Lacroix, B., Hessamian-Alinejad, A., Daum, S., Fischer, G., Erdmann, F. & Alvarez, B. (2006). *Angew. Chem.* 45, 7454–7458.
- Campbell, N. A. (2003). *Biologie. Spektrum-Akademischer Vlg.*
- Clubb, R. (1995). *Protein Science* 4, 855–862.
- Crenshaw, D., Yang, J., Means, A. & Kornbluth, S. (1998). *The EMBO Journal* 17, 1315–1327.
- Damberg, P., Jarvet, J., Allard, P., Mets, U., Rigler, R. & Graslund, A. (2002). *Biophys. J* 83, 2812–2825.
- de Couet, H., Fong, K., Weeds, A., McLaughlin, P. & Miklos, G. (1995). *Genetics* 141, 1049–1059.
- Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J. & Bax, A. (1995). *J Biomol NMR* 6, 277–293.
- Engbrecht, J., Voelkel-Meiman, K. & Roeder, G. (1991). *Cell* 66, 1257–68.
- Esnault, S., Shen, Z., Whitesel, E. & Malter, J. (2006). *The Journal of Immunology* 177, 6999.
- Fischer, S., Dunbrack Jr, R. & Karplus, M. (1994). *Journal of the American Chemical Society* 116, 11931–11937.

- Fujimori, F., Takahashi, K., Uchida, C. & Uchida, T. (1999). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 265, 658–663.
- Fushman, D., Weisemann, R., Thüring, H. & Rüterjans, H. (1994). *Journal of Biomolecular NMR* 4, 61–78.
- Gillespie, J. & Shortle, D. (1997). *Journal of Molecular Biology* 268, 58–169.
- Harris, R. K. (1986). *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: A Physiocochemical View*. Longman Publishing Group.
- Hennig, L., Christner, C., Kipping, M., Schelbert, B., Ruecknagel, K., Grabley, S., Kuellertz, G. & Fischer, G. (1998). *Biochemistry* 37, 5953–5960.
- Horton, H. R., Moran, L. A., Rawn, J. D. & Scrimgeour, K. G. (2008). *Biochemie*. 4. Aufl. edition, Pearson Studium.
- Huang, H., Forsburg, S., John, U., O’Connell, M. & Hunter, T. (2001). *Journal of Cell Science* 114, 3779–3788.
- Jacobs, D. M., Saxena, K., Vogtherr, M., Bernado, P., Pons, M. & Fiebig, K. M. (2003). *J Biol Chem* 278, 26174–26182.
- Jacobsen, N. E. (2007). *NMR Spectroscopy Explained: Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology*. 1 edition, Wiley-Interscience.
- Joseph, J., Yeh, E., Swenson, K., Means, A. & Winkler, K. (2003). *Progress in Cell Cycle Research* 5, 477–488.
- Kay, B., Williamson, M. & Sudol, M. (2000). *The FASEB Journal* 14, 231–241.
- Kay, L., Nicholson, L., Delaglio, F., Bay, A. & Torchia, D. (1992). *Journal of magnetic resonance* 97, 359–375.
- Kim, C.-J., Cho, Y.-G., Park, Y.-G., Nam, S.-W., Kim, S.-Y., Lee, S.-H., Yoo, N.-J., Lee, J.-Y. & Park, W.-S. (2005). *World J Gastroenterol* 11, 5006–5009.
- Kops, O., Eckerskorn, C., Hottenrott, S., Fischer, G., Mi, H. & Tropschug, M. (1998). *Journal of Biological Chemistry* 273, 31971–31976.
- Landrieu, I., De Veylder, L., Fruchart, J., Odaert, B., Casteels, P., Portetelle, D., Van Montagu, M., Inze, D. & Lippens, G. (2000). *Journal of Biological Chemistry* 275, 10577–10581.

- Li, Z., Li, H., Devasahayam, G., Gemmill, T., Chaturvedi, V., Hanes, S. D. & Roey, P. V. (2005). *Biochemistry* 44, 6180–6189.
- Loeffler, G. & Petrides, P. E. (2002). *Biochemie und Pathobiochemie* (Springer-Lehrbuch). 7., voellig neu bearb. aufl. edition, Springer.
- Lu, K., Hanes, S. & Hunter, T. (1996). *Nature* 380, 544–547.
- Lu, P., Wulf, G., Zhou, X., Davies, P. & Lu, K. (1999a). *Letters to Nature* 749, 53–60.
- Lu, P., Zhou, X., Shen, M. & Lu, K. (1999b). *Science* 283, 1325.
- Maleszka, R., Hanes, S., Hackett, R., de Couet, H. & Miklos, G. (1996). *Proc Natl Acad Sci US A* 93, 447–451.
- Nakashima, M., Meirmanov, S., Naruke, Y., Kondo, H., Saenko, V., Rogounovitch, T., Shimizu-Yoshida, Y., Takamura, N., Namba, H., Ito, M., Abrosimov, A., Lushnikov, E., Roumiantsev, P., Tsyb, A., Yamashita, S. & Sekine, I. (2004). *J Pathol* 202, 446–455.
- Oakley, B. & Morris, R. (1983). *The Journal of Cell Biology* 96, 1155–1158.
- Rahfeld, J., Rucknagel, K., Schelbert, B., Ludwig, B., Hacker, J., Mann, K. & Fischer, G. (1994). *FEBS Lett* 352, 180–4.
- Ranganathan, R., Lu, K., Hunter, T. & Noel, J. (1997). *Cell* 89, 875–86.
- Rippmann, J., Hobbie, S., Daiber, C., Guilliard, B., Bauer, M., Birk, J., Nar, H., Garin-Chesa, P., Rettig, W. & Schnapp, A. (2000). *Cell Growth and Differentiation* 11, 409.
- Schreiber, S., Lui, J., Albers, M., Rosen, M., Standaert, R., Wandless, T. & Somers, P. (1992). *Tetrahedron* 48, 2545–2558.
- Shen, Z., Esnault, S. & Malter, J. (2005). *Nature Immunology* 6, 1280–1287.
- Siekierka, J., Hung, S., Poe, M., Lin, C. & Sigal, N. (1989). *Nature* 341, 755–757.
- Sinnen, C. (2004). Master's thesis FH-Gelsenkirchen, Abt. Recklinghausen/ Beiersdorf AG, Hamburg.
- Takahashi, K., Uchida, C., Shin, R., Shimazaki, K. & Uchida, T. (2008). *Cell Mol Life Sci.* 65(3), 359–75.

- Takahashi, N., Hayano, T. & Suzuki, M. (1989). *Nature* 337, 473–475.
- Verdecia, M., Bowman, M., Lu, K., Hunter, T. & Noel, J. (2000). *Nature Structural Biology* 7, 639–643.
- Winkler, K., Swenson, K., Kornbluth, S. & Means, A. (2000). *Science* 287, 1644.
- Wulf, G., Ryo, A., Wulf, G., Lee, S., Niu, T., Petkova, V. & Lu, K. (2001). *The EMBO Journal* 20, 3459–3472.
- Xu, Y. & Manley, J. (2007). *Molecular Cell* 26, 287–300.
- Yaffe, M., Schutkowski, M., Shen, M., Zhou, X., Stukenberg, P., Rahfeld, J., Xu, J., Kuang, J., Kirschner, M., Fischer, G. et al. (1997). *Science* 278, 1957.
- Zhang, Y., Daum, S., Wildemann, D., Zhou, X., Verdecia, M., Bowman, M., Lücke, C., Hunter, T., Lu, K., Fischer, G. et al. (2007). *ACS Chem. Biol* 2, 320–328.
- Zhou, X., Lu, P., Wulf, G. & Lu, K. (1999). *Cell Mol Life Sci* 56, 788–806.

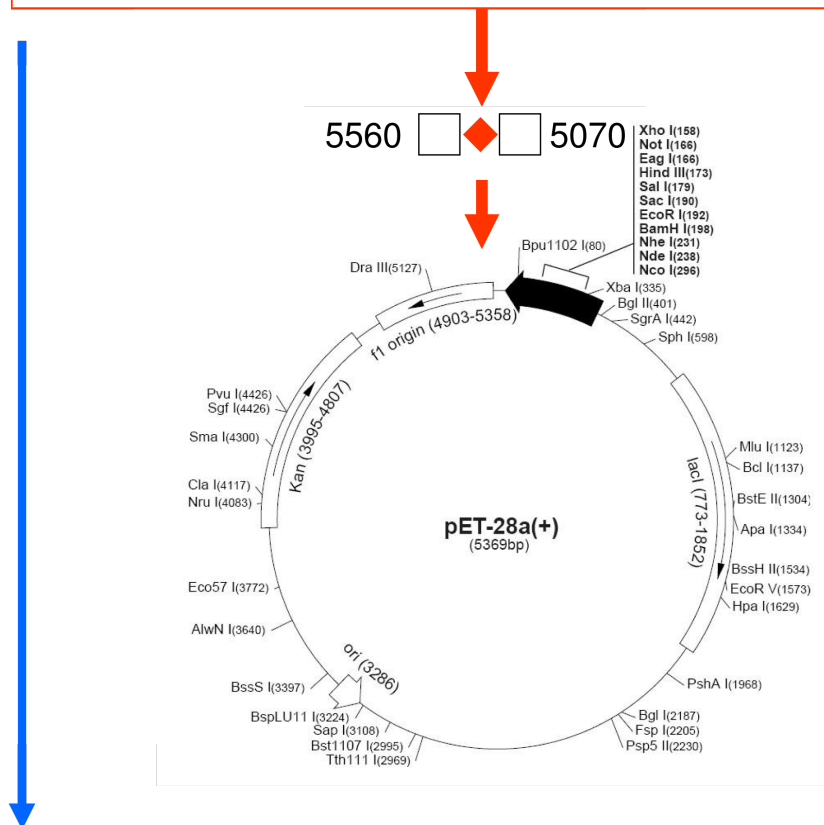
Anhang

Anlagen zu Material und Methoden

Anlagen zu Kap. 2.3

Nukleinsäuresequenz des Inserts für Pin1_{fl}

```
atggcggacgaggagaagctgccgcccggctgggagaagcgcgatgagccgcagctcaggccgagt  
gtactacttcaaccacatcactaacgccagccagtgaggagcggcccagcggcaacagcagcagtg  
gtggcaaaaacgggcagggggagcctgccagggtccgctgctcgacacctgctggtgaagcacagc  
cagtcacggcggccctcgtcctggcggcaggagaagatcacccggaccaaggaggagccctgga  
gctgatcaacggctacatccagaagatcaagtcgggagaggaggactttgagtcctctggcctcac  
agttcagcgactgcagctcagccaaggccagggagacctgggtgccttcagcagaggtcagatg  
cagaagccatttgaagacgcctcgtttgcgctgccgacggggagatgagcgggcccgtgttcac  
ggattccggcatccacatcatcctccgcactgagtga
```



Aminosäuresequenz des Inserts

```
1 MADEEKLPPG WEKRMSRSSG RVYYFNHITN ASQWERPSGN SSSGKNGQG EPARVRCSHL 60  
61 LVKHSQSRRP SSWRQEKITR TKEEALELIN GYIQIKSGE EDFESLASQF SDCSSAKARG 120  
121 DLGAFSRGQM QKPFEDASFA LRTGEMSGPV FTDSGIHIL RTE 163
```

Abb. 6.1: Details zum Klon Pin1_{fl}

Anlagen zu den Messreihen

Allgemein

Tab. 6.1: Übersicht über Aminosäuren, die in den ^{15}N -HSQC-Spektrum unter Einfluss von Peg oder des Peptidis Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA Verschiebungen aufzeigen oder aufspalten. Links außen in der Spalte werden Hinweise zur Lokalisierung der Aminosäuren gegeben. Peg-BS steht für Peg-Bindungsseite.

	Titrationsen				
	Peg			Peptid	
	AS	Shift	Split	Shift	Split
Katalyt. Zentrum	H59	nein	nein	ja	nein
	C113	nein	nein	ja	ja
	H157	nein	nein	ja	nein
	S154	nein	nein	ja	nein
Pro-BS	L122	nein	nein	ja	nein
	M130	ja	nein	ja	nein
	F134	nein	nein	ja	nein
Peg-BS	S16	nein	nein	ja	nein
	Y23	ja	ja	ja	ja
	S32	ja	ja	ja	ja
	W34	ja	nein	ja	ja
	I96	nein	nein	nein	nein
	F103	nein	nein	ja	nein
	M146	nein	nein	ja	nein
	L160	nein	nein	ja	nein

Anlagen zu Kap. 3.1

von Pin1

Einfluss der Temperatur auf die Struktur

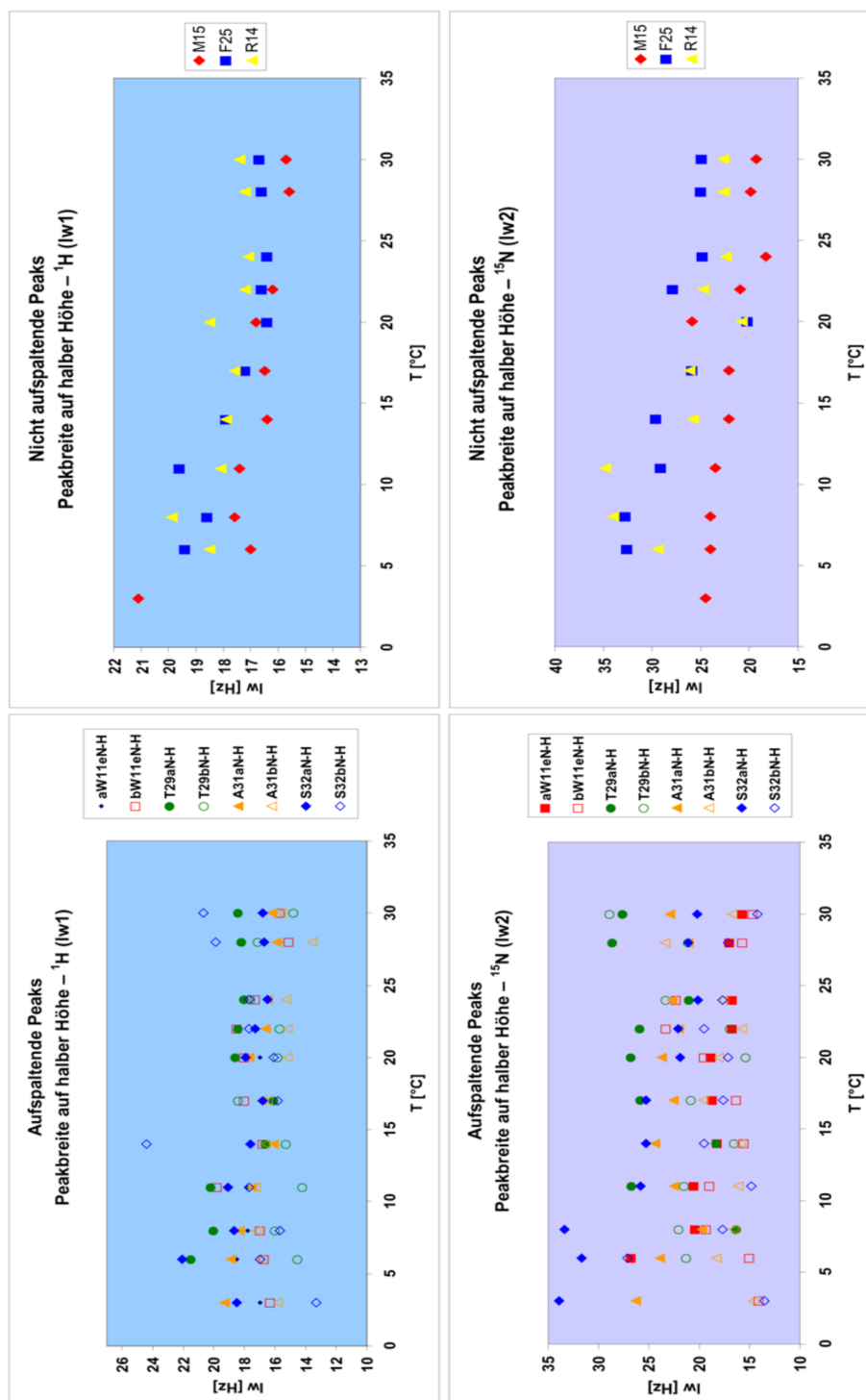


Abb. 6.2: Vergleich der Linienbreiten auf halber Höhe von aufspaltenden und ausgewählten, nicht aufspaltenden Peaks der Temperaturmessung.

Anlagen zu Kap. 3.2

Messreihe mit Polyethylenglykol

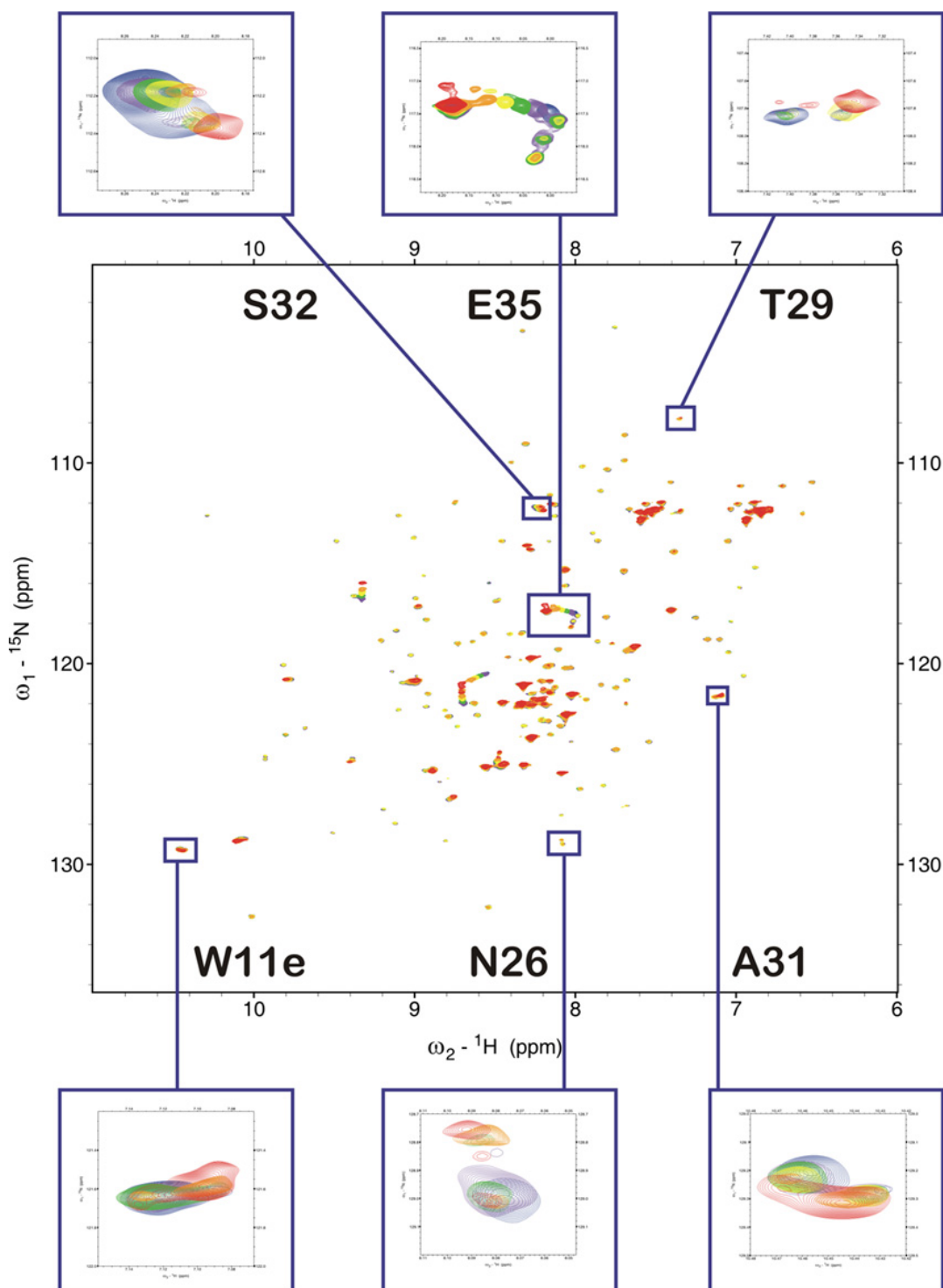
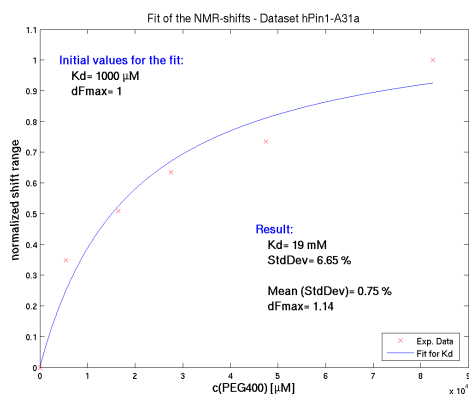
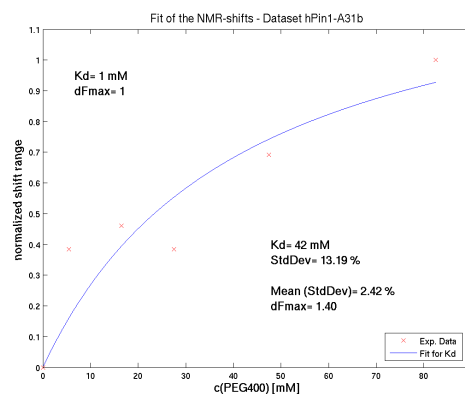


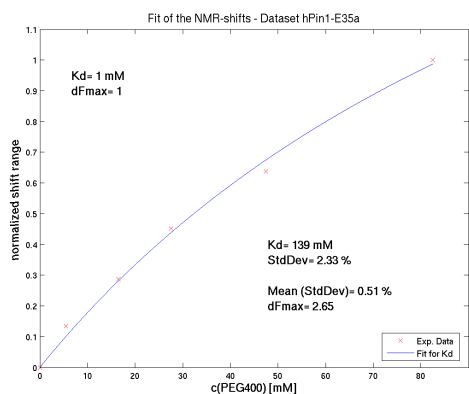
Abb. 6.3: Überlagerung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren unter Einfluss von 0–3% Peg400. Das Spektrum der Probe mit der niedrigsten Konzentration ist blau eingefärbt, das mit der höchsten rot. Aufspaltende Peaks sind herausgezoomt und separat dargestellt.



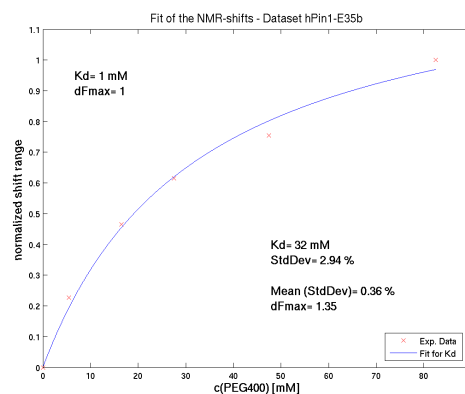
(a) A31a



(b) A31b



(c) E35a



(d) E35b

Abb. 6.4: Beispielhafte Darstellung der Fitergebnisse für die K_D -Wert-Berechnung mit Matlab anhand der Peaks der Populationen A und B der Aminosäuren A31 und E35 unter Einfluss von Peg. Aufgetragen sind die normalisierten Shiftdistanzen (normalized shift range) gegen die Konzentration von Peg400. Die Ergebnisse sind in den Plots dargestellt. K_D =Dissoziationskonstante, ΔF_{max} =Max. Signalintensität bei Sättigung, StdDev=Standardabweichung.

Tab. 6.2: Ergebnis des Matlab-Fits für Pin1_{fl} für die Titration mit Peg. AS=Aminosäure, K_D =Dissoziationskonstante, ΔF_{max} =Max. Signalintensität bei Sättigung, Stabw=Standardabweichung

AS	K_D [μ M]	ΔF_{max}	Stabw
W11	23	1,22	0,11
aW11 ϵ	64	1,74	
bW11 ϵ	54	1,67	

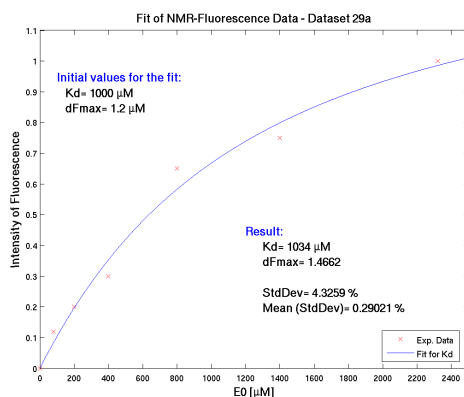
... weiter auf der nächsten Seite

Tab. 6.2: Ergebnis des Matlab-Fits für Pin1_{fl} für die Titration mit Peg. AS=Aminosäure, K_D =Dissoziationskonstante, ΔF_{max} =Max. Signalintensität bei Sättigung, Stabw=Standardabweichung

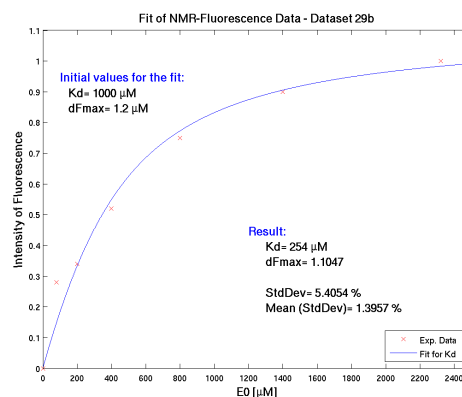
AS	K_D [μM]	ΔF_{max}	Stabw
E12	55	1,57	0,06
R14	804	10,47	0,10
Y23a	67	1,79	0,02
Y23b	99	2,18	0,02
Y24	48	1,46	0,10
F25	14	1,01	0,15
T29a	3447	42,97	0,11
T29b	9	0,86	0,17
A31a	19	1,14	0,07
A31b	–	–	–
S32a	87	2,13	0,06
S32b	88	2,03	0,05
Q33	177	3,12	0,02
W34	215	3,57	0,02
E35	118	2,40	0,02
R36	70	1,91	0,07
S105	381	5,49	0,05
K117	2081	25,47	0,06
F125	–	–	–
M130	3865	44,87	0,08
A140	422	5,61	0,17

Anlagen zu Kap. 3.3

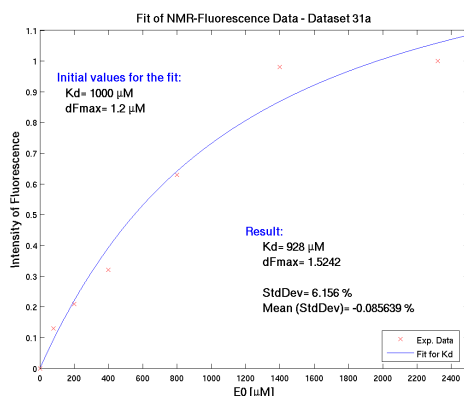
Peptid Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA



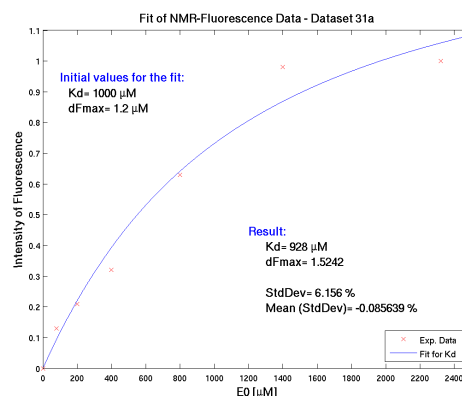
(a) T29a



(b) T29b



(c) A31a



(d) A31b

Abb. 6.5: Beispielhafte Darstellung der Fitergebnisse für die K_D -Wert-Berechnung mit Matlab anhand der Peaks der Populationen A und B der Aminosäuren T29 und A31 unter Einfluss des Peptids. Aufgetragen sind die normalisierten Shiftdistanzen (normalized shift range) gegen die Konzentration des Peptids. Die Ergebnisse sind in den Plots dargestellt. K_D =Dissoziationskonstante, ΔF_{max} =Max. Signalintensität bei Sättigung, StdDev=Standardabweichung.

Tab. 6.3: Gesamtübersicht Chemischer Verschiebungen (Δ) in ^{15}N -HSQC-Spektren für Peaks Pin1_{fl} Konzentrationen von 80–2320 μM des Peptids Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA.

Aminosäure	Δ (80)	Δ (200)	Δ (400)	Δ (800)	Δ (1400)	Δ (2320)
12	0,0042	0,0086	0,0133	0,0205	0,0295	0,0337
13a		0,0121	0,0135	0,0244	0,0329	0,0404

... weiter auf der nächsten Seite

Tab. 6.3: Gesamtübersicht Chemischer Verschiebungen (Δ) in ^{15}N -HSQC-Spektren für Peaks Pin1_{fl} Konzentrationen von 80–2320 μM des Peptids Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA.

Aminosäure	Δ (80)	Δ (200)	Δ (400)	Δ (800)	Δ (1400)	Δ (2320)
13b	0,0041	0,0284	0,0455	0,0736	0,0892	0,1016
14	0,0041	0,0219	0,0333	0,0537	0,0691	0,0811
15	0,0024	0,0097	0,0185	0,0305	0,0378	0,0453
16	0,0155	0,0313	0,0443	0,0698	0,0890	0,1028
20	0,0115	0,0303	0,0533	0,0928	0,1189	0,1385
21	0,0164	0,0385	0,0615	0,1057	0,1369	0,1509
22a	0,0053	0,0066	0,0105	0,0195	0,0250	0,0334
22b	0,0083	0,0158	0,0237	0,0393	0,0503	0,0590
23a		0,0051	0,0116	0,0254	0,0377	0,0493
23b	0,0111	0,0256	0,0429	0,0661	0,0828	0,0955
24a	0,0023	0,0045	0,0080	0,0116	0,0155	0,0184
24b	0,0092	0,0133	0,0149	0,0234	0,0315	0,0337
25b	0,0071	0,0164	0,0274	0,0457	0,0601	0,0710
26a	0,0060	0,0098	0,0151	0,0270	0,0368	0,0417
26b	0,0041	0,0060	0,0098	0,0161	0,0208	0,0204
27a	0,0021	0,0080	0,0152	0,0301	0,0401	0,0471
27b	0,0145	0,0339	0,0580	0,0835	0,1122	0,1269
28a				0,0123	0,0131	0,0181
28b	0,0040	0,0088	0,0142	0,0217	0,0283	0,0325
29a	0,0012	0,0021	0,0031	0,0067	0,0077	0,0103
29b	0,0112	0,0139	0,0208	0,0304	0,0363	0,0404
30a	0,0005	0,0068	0,0071	0,0084	0,0103	0,0088
30b	0,0074	0,0184	0,0318	0,0509	0,0673	0,0744
31a	0,0018	0,0031	0,0046	0,0091	0,0141	0,0144
31b	0,0142	0,0287	0,0445	0,0695	0,0903	0,0994
32a	0,0096	0,0129	0,0230	0,0482	0,0642	0,0754
32b	0,0122	0,0286	0,0450	0,0772	0,0995	0,1187
33a			0,0560	0,0892	0,1155	0,1326
33b	0,0217	0,0510	0,0878	0,1496	0,1937	0,2193
34b	0,0202	0,0471	0,0771	0,1303	0,1682	0,1990
35a					0,1614	0,1844

... weiter auf der nächsten Seite

Tab. 6.3: Gesamtübersicht Chemischer Verschiebungen (Δ) in ^{15}N -HSQC-Spektren für Peaks Pin1_{fl} Konzentrationen von 80–2320 μM des Peptids Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA.

Aminosäure	Δ (80)	Δ (200)	Δ (400)	Δ (800)	Δ (1400)	Δ (2320)
35b	0,0251	0,0542	0,0847	0,1393	0,1904	0,2217
36		0,0034	0,0056	0,0112	0,0131	0,0164
38	0,0014	0,0037	0,0056	0,0094	0,0130	0,0144
54	0,0024	0,0055	0,0102	0,0194	0,0283	0,0337
55	0,0022	0,0060	0,0099	0,0189	0,0268	0,0318
56	0,0039	0,0055	0,0071	0,0090	0,0121	0,0134
57	0,0052	0,0146	0,0268	0,0537	0,0749	0,0932
58	0,0005	0,0022	0,0028	0,0073	0,0113	0,0136
59	0,0060	0,0113	0,0192	0,0365	0,0508	0,0633
62	0,0031	0,0059	0,0109	0,0176	0,0249	0,0298
63		0,0030	0,0031	0,0074	0,0103	0,0140
64	0,0030	0,0089	0,0148	0,0318	0,0456	0,0587
65	0,0021	0,0053	0,0074	0,0146	0,0240	0,0279
66	0,0032	0,0074	0,0108	0,0216	0,0322	0,0379
67	0,0032	0,0057	0,0080	0,0158	0,0228	0,0298
68	0,0125	0,0272	0,0488	0,0930	0,1348	0,1724
69	0,0155	0,0422	0,0730	0,1353	0,2005	0,2446
71	0,0035	0,0084	0,0128	0,0217	0,0321	0,0373
72	0,0020	0,0070	0,0131	0,0241	0,0331	0,0421
73	0,0125	0,0343	0,0588	0,1344	0,1512	0,1871
78			0,0034	0,0111	0,0139	0,0199
79	0,0031	0,0074	0,0094	0,0172	0,0204	0,0245
81	0,0020	0,0023	0,0042	0,0065	0,0106	0,0117
82	0,0032	0,0111	0,0181	0,0365	0,0557	0,0663
83	0,0014	0,0003	0,0044	0,0097	0,0124	0,1510
85		0,0023	0,0031	0,0070	0,0108	0,0128
88		0,0034	0,0058	0,0104	0,0157	0,0190
90	0,0020	0,0050	0,0044	0,0055	0,0083	0,0089
91	0,0041	0,0050	0,0083	0,0127	0,0195	0,0204
92		0,0020	0,0021	0,0053	0,0075	0,0084
93	0,0031	0,0026	0,0044	0,0055	0,0083	0,0089

... weiter auf der nächsten Seite

Tab. 6.3: Gesamtübersicht Chemischer Verschiebungen (Δ) in ^{15}N -HSQC-Spektren für Peaks Pin1_{fl} Konzentrationen von 80–2320 μM des Peptids Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA.

Aminosäure	Δ (80)	Δ (200)	Δ (400)	Δ (800)	Δ (1400)	Δ (2320)
94	0,0045	0,0067	0,0116	0,0173	0,0227	0,0235
98	0,0023	0,0062	0,0100	0,0160	0,0210	0,0270
99		0,0025	0,0039	0,0071	0,0100	0,0113
100	0,0042	0,0093	0,0164	0,0242	0,0318	0,0313
101	0,0016	0,0051	0,0095	0,0156	0,0187	0,0228
102	0,0002	0,0010	0,0035	0,0070	0,0106	0,0134
103	0,0027	0,0069	0,0094	0,0145	0,0175	0,0198
104	0,0006	0,0023	0,0045	0,0100	0,0136	0,0174
105	0,0030	0,0080	0,0100	0,0160	0,0210	0,0210
106			0,0043	0,0070	0,0089	0,0096
108	0,0033	0,0046	0,0054	0,0072	0,0097	0,0087
111		0,0030	0,0031	0,0036	0,0057	0,0063
112		0,0041	0,0030	0,0060	0,0092	0,0111
113	0,0030	0,0070	0,0120	0,0170	0,0290	0,0380
114		0,0219	0,0410	0,0843	0,1193	0,1469
115	0,0076	0,0178	0,0294	0,0554	0,0781	0,0949
116		0,0040	0,0070	0,0152	0,0230	0,0288
117	0,0025	0,0046	0,0107	0,0210	0,0303	0,0388
118	0,0029	0,0056	0,0089	0,0171	0,0233	0,0303
120	0,0037	0,0049	0,0053	0,0111	0,0119	0,0159
121		0,0012	0,0032	0,0063	0,0097	0,0106
122	0,0100	0,0168	0,0273	0,0517	0,0740	0,0901
123	0,0011	0,0046	0,0086	0,0155	0,0243	0,0275
125	0,0052	0,0126	0,0213	0,0404	0,0610	0,0734
126	0,0008	0,0056	0,0086	0,0194	0,0282	0,0371
127	0,0062	0,0138	0,0225	0,0424	0,0590	0,0702
128	0,0012	0,0037	0,0079	0,0132	0,0160	0,0177
129	0,0073	0,0172	0,0296	0,0533	0,0737	0,0888
130	0,0128	0,0300	0,0539	0,0937	0,1367	0,1660
131	0,0037	0,0063	0,0095	0,0160	0,0225	0,0264
134	0,0033	0,0085	0,0159	0,0275	0,0345	0,0420

... weiter auf der nächsten Seite

Tab. 6.3: Gesamtübersicht Chemischer Verschiebungen (Δ) in ^{15}N -HSQC-Spektren für Peaks Pin1_{fl} Konzentrationen von 80–2320 μM des Peptids Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA.

Aminosäure	Δ (80)	Δ (200)	Δ (400)	Δ (800)	Δ (1400)	Δ (2320)
136	0,0020	0,0062	0,0109	0,0212	0,0294	0,0371
137	0,0025	0,0046	0,0077	0,0128	0,0165	0,0204
138	0,0026	0,0085	0,0147	0,0280	0,0355	0,0420
139	0,0103	0,0270	0,0425	0,0748	0,0972	0,1138
140	0,0086	0,0191	0,0313	0,0526	0,0683	0,0778
141	0,0041	0,0121	0,0211	0,0334	0,0434	0,0489
142	0,0054	0,0082	0,0146	0,0241	0,0330	0,0380
143	0,0015	0,0034	0,0049	0,0090	0,0122	0,0159
144	0,0020	0,0025	0,0035	0,0080	0,0113	0,0155
146	0,0034	0,0060	0,0087	0,0134	0,0173	0,0172
147	0,0006	0,0061	0,0090	0,0151	0,0187	0,0215
148	0,0037	0,0049	0,0093	0,0169	0,0217	0,0249
150	0,0054	0,0106	0,0160	0,0263	0,0365	0,0438
151		0,0021	0,0059	0,0088	0,0138	0,0166
152	0,0029	0,0062	0,0072	0,0140	0,0168	0,0226
153	0,0021	0,0076	0,0143	0,0304	0,0437	0,0687
154	0,0014	0,0033	0,0106	0,0132	0,0269	0,0340
155	0,0066	0,0126	0,0199	0,0346	0,0477	0,0572
156	0,0013	0,0040	0,0081	0,0175	0,0238	0,0307
157		0,0032	0,0050	0,0120	0,0150	0,0190
158	0,0034	0,0089	0,0117	0,0240	0,0346	0,0414
159	0,0038	0,0115	0,0140	0,0301	0,0381	0,0412
160		0,0025	0,0039	0,0071	0,0100	0,0113
161	0,0026	0,0025	0,0070	0,0130	0,0210	0,0240
162	0,0085	0,0203	0,0299	0,0329	0,0243	0,0190

Tab. 6.4: Ergebnis des Matlab-Fits für Pin1_{fl} für die Titration mit dem Peptid Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA. AS=Aminosäure, K_D =Dissoziationskonstante, ΔF_{max} =Max. Signalintensität bei Sättigung, Stabw=Standardabweichung

AS	ΔF_{max}	K_D [μ M]	Stabw
12	1,3761	759	2,28E-02
a13	1,4435	936	5,48E-02
b13	1,2532	506	3,25E-02
14	1,3128	653	2,53E-02
15	1,3387	710	2,36E-02
16	1,2303	493	2,20E-02
20	1,3751	751	1,78E-02
21	1,3121	591	2,11E-02
a22	1,5305	1186	3,78E-02
b22	1,2799	595	1,97E-02
b23	1,24	503	3,31E-03
a24	1,2932	638	1,34E-02
b24	1,152	329	7,49E-02
b25	1,3646	752	5,68E-03
a26	1,3796	752	2,80E-02
b26	1,2109	358	4,83E-02
a27	1,5583	1107	3,40E-02
b27	1,2544	529	1,31E-02
b28	1,2589	542	7,68E-03
a29	1,4662	1034	4,33E-02
b29	1,1047	254	5,41E-02
b30	1,3075	589	1,68E-02
a31	1,5242	928	6,16E-02
b31	1,238	468	1,66E-02
a32	1,5394	1075	3,98E-02
b32	1,3546	740	1,11E-02
a33	1,5824	1109	9,49E-02
b33	1,338	666	1,53E-02
b34	1,3473	718	8,22E-03
b35	1,3762	769	1,32E-02

... weiter auf der nächsten Seite

Tab. 6.4: Ergebnis des Matlab-Fits für Pin1_{fl} für die Titration mit dem Peptid Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA. AS=Aminosäure, K_D =Dissoziationskonstante, ΔF_{max} =Max. Signalintensität bei Sättigung, Stabw=Standardabweichung

AS	ΔF_{max}	K_D [μ M]	Stabw
36	1,4401	919	4,83E-02
38	1,3701	717	2,54E-02
54	1,7025	1423	2,39E-02
55	1,6039	1225	2,10E-02
57	1,7122	1483	2,03E-02
58	2,0613	2164	4,60E-02
59	1,6368	1336	1,64E-02
62	1,4702	972	1,10E-02
63	2,0821	2357	4,65E-02
64	1,964	2032	2,28E-02
65	1,8515	1715	4,07E-02
66	1,6515	1316	2,91E-02
67	1,7963	1711	2,36E-02
68	1,8315	1762	1,22E-02
69	1,7366	1520	1,75E-02
71	1,5083	1029	2,36E-02
72	1,6792	1433	1,36E-02
73	1,4396	897	5,37E-02
79	1,2464	544	3,17E-02
81	1,5282	1039	5,04E-02
82	1,8157	1654	3,08E-02
85	1,9171	1843	4,88E-02
88	1,7676	1580	3,30E-02
91	1,3505	645	5,66E-02
94	1,2089	366	3,35E-02
98	1,4256	947	1,69E-02
100	1,1996	343	3,72E-02
101	1,309	664	2,09E-02
102	2,2089	2526	3,83E-02
103	1,1577	345	2,29E-02

... weiter auf der nächsten Seite

Tab. 6.4: Ergebnis des Matlab-Fits für Pin1_{fl} für die Titration mit dem Peptid Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA. AS=Aminosäure, K_D =Dissoziationskonstante, ΔF_{max} =Max. Signalintensität bei Sättigung, Stabw=Standardabweichung

AS	ΔF_{max}	K_D [μM]	Stabw
104	1,8904	1867	2,98E-02
105	1,2006	330	4,53E-02
112	1,5623	1182	8,81E-02
113	1,9536	2077	2,90E-02
114	1,8235	1694	3,54E-02
115	1,6108	1264	1,53E-02
116	2,0953	2276	3,67E-02
122	1,6283	1303	2,19E-02
125	1,7518	1539	2,20E-02
126	2,1693	2493	2,76E-02
127	1,5452	1111	1,90E-02
129	1,5438	1117	1,38E-02
130	1,6408	1329	1,21E-02
131	1,4021	833	2,43E-02
134	1,3933	826	1,52E-02
136	1,7263	1527	1,79E-02
137	1,3582	781	1,39E-02
138	1,4366	871	2,83E-02
139	1,3679	752	1,68E-02
140	1,3257	645	1,47E-02
141	1,3045	599	1,52E-02
142	1,3857	777	2,19E-02
143	1,5986	1304	1,78E-02
144	2,0397	2270	3,54E-02
146	1,1753	298	4,30E-02
147	1,2886	581	3,59E-02
148	1,3706	733	3,26E-02
150	1,4001	851	1,66E-02
151	1,7738	1585	4,02E-02
152	1,3663	868	4,82E-02

... weiter auf der nächsten Seite

Tab. 6.4: Ergebnis des Matlab-Fits für Pin1_{fl} für die Titration mit dem Peptid Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA. AS=Aminosäure, K_D =Dissoziationskonstante, ΔF_{max} =Max. Signalintensität bei Sättigung, Stabw=Standardabweichung

AS	ΔF_{max}	K_D [μ M]	Stabw
153	3,8625	6477	1,76E-02
154	2,577	3364	4,99E-02
155	1,4402	921	1,61E-02
156	1,8904	1867	2,98E-02
157	1,6839	1417	4,75E-02
158	1,6313	1285	3,23E-02
159	1,3531	646	5,04E-02
160	1,518	996	4,50E-02
161	1,8459	1698	4,87E-02

Tab. 6.5: Aufnahmeparameter der Spektren.

Varian 600 MHz			
hPin1			
Datenpunkte	Temperatur	Peg400	Peptid
ν_H/ν_N	1024x160	1024x512	1024x600
Spektrale Weite (^1H)	600 MHz/60 MHz	600 MHz/60 MHz	600 MHz/60 MHz
Spektrale Weite (^{15}N)	10.000 Hz	10.000 Hz	10.000 Hz
	2.200 Hz	2.200 Hz	2.200 Hz
WW			
shortPin1			
Datenpunkte	Temperatur	Peg400	Temperatur
ν_H/ν_N	1024x512	1024x128	1024x512
Spektrale Weite (^1H)	600 MHz/60 MHz	600 MHz/60 MHz	600 MHz/60 MHz
Spektrale Weite (^{15}N)	10.000 Hz	10.000 Hz	10.000 Hz
	2.200 Hz	2.200 Hz	2.200 Hz
Bruker 700 MHz			
hPin1			
Datenpunkte	HetNOE		
ν_H/ν_N	2048x1024		
Spektrale Weite (^1H)	700 MHz/70 MHz		
Spektrale Weite (^{15}N)	11.262 Hz		
	2.838		

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich bei meiner Promotion mit ihrer Arbeitskraft und/oder mental unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt dabei Prof. Dr. Peter Bayer, der mir mein Promotionsvorhaben ermöglicht und mich als FH-Kind in die Uni-Welt aufgenommen hat. Danke für die interessanten Diskussionen, dafür dass du immer als Ansprechpartner zur Verfügung gestanden hast und mich auch bei Fehlschlägen immer wieder aufgemunter hast.

Jonathan W. Müller, der immer als Ansprechpartner und Freund zur Verfügung stand, wenn es ein Problem zu lösen oder neue Ideen zu entwickeln gab, egal an welchem Ort: an der Uni, beim Falafel-Mann oder auf einer sonnigen Außenterasse.

Bernhard Griewel, für die Unterstützung bei meinen Messungen in Dortmund und für den super Support!

Matthias Rabiller für die Einarbeitung mit der NMR-Software und den Paper-Support. Merci Monsieur!

Prof. Andrzej Ejchart, für die *Lineshape-Analaysys*.

Bianca Reichstein, die mich mit neuen Labormethoden vertraut gemacht hat, und mich in meiner Einarbeitungsphase unterstützt hat. Danke auch, dass du mich optimal auf meine Mikrobiologie-Prüfung vorbereitet hast.

Nina Link, die auf so ziemlich alle methodischen Probleme im Labor eine Antwort hat.

Labas! Alma Rüppel, du gute Seele im Labor. Es kann sich wohl kaum ein anderer so verbiegen, der chronische Rückenbeschwerden hat, und dann noch Dt. Meisterin im Turmspringen wird. Wer dich kennt, muss dich sofort in sein Herz schließen, und das liegt nicht nur an den vielen von dir vorgeschlagenen grammatikalischen Neuerungen für die deutsche Sprache. Du hast so viel für mich gemacht, Dinge wiederholt und ausprobiert, die einfach nicht klappen wollten, bis es irgendwann funktioniert hat. Vielen Dank! Auch dafür, dass du immer ein Kaffee-Pad für mich übrig hattest.

Tiiiiiiiiieenschen, die lieber nur Tina Stratmann heißt, und immer dafür sorgt, dass alle dazu beitragen, dass das Labor so aussieht, als hätte Meister Proper persönlich geputzt. Meine Versuche, den letzten Freitag im Monat frei zu nehmen, sind dann auch meistens an deinem Widerstand gescheitert ;).

Gila Schulte-Eickholt, die immer weiß, wo man was ausfüllen, abheften und hinschicken muss, welche Nummer in welches Feld gehört und wann man Urlaub hat.

Peter Binz, danke für deine Hilfsbereitschaft deine Unterstützung bei der Einarbeitung am Bruker-Spektrometer und dafür, dass du immer einen guten Kaffee in der NMR-Halle für mich übrig hattest.

Viktoria Zaslavski, Privet Sasr...! Mit Alma hast du alles dafür getan, meine Russisch-Kenntnisse zu verbessern - mit Erfolg, zumindest wenn man das prozentual betrachtet und davon ausgeht, dass mein voriges Vokabular aus $n-1$ Wörtern bestand.

Unserem Sonnenschein Cristina Hartmann-Fatu alles Gute.

Akuma D. Saningong, danke, dass ich dich als Freund gefunden habe. Wir machen zwar wenig NMR und Zellbiologie zusammen, aber das, was uns wirklich verbindet findet außerhalb der Arbeit statt. Auch unser Verein verbindet uns, und er wird uns noch viele schöne Momente bescheren. Dank dir konnte ich auch endlich mal tieferen Einblick in die afrikanische Küche gewinnen.

Anja Matena. Wenn Hilfsbereitschaft einen Namen hätte, dann Anja.

André Knitsch. Mit dir ist es immer lustig. Ob beim Kaffee, Spanisch, Fussball oder kochen.

Lena Gebel, ständig auf der Suche im Labor nach Pipetten und Stiften, kann man sich bei einer Tasse Kaffee doch immer ganz gut mit dir entspannen. Die neuesten Kino-News sind nicht weit, wenn du in der Nähe bist.

Daniel Kessler, Sasran. Andrej Ereameev, Christoph Lederer und Imadeldin Elfaki einen großen Dank. Andrej und Christoph wohnten bis jetzt etwas abgelegen in der unteren und oberen Etage unseres Hauses. Aber wenn man sich getroffen hat, war es mir eine Ehre ;) Das Bier im Praktikum wird dann wohl ab diesem Semester mit

bayrischem Braumeister auch noch besser werden.

Carola Schubert als kompetenter Ansprechpartnerin in Computer- und Netzwerkfragen und für die Unterstützung beim Support und der Inbetriebnahme unserer Rechner.

Manuel Prinz und Stanislav Jakushev danke ich für ihre Hilfe bei verzwickten Linux-Problemen, die sich vor allem aus der sich verselbständigen Rechtevergabe und unbekannten, fehlender Treiber hergeleitet haben.

Thomas Knura, Steffi Wüsten, Anne Riemer, Daniel Grum, Rebecca Mross, Ricarda Maltaner, Julian Priester-Hammerschmidt und...ich hoffe ich habe keinen vergessen... Auch ihr habt das Gesicht des Biobereichs und der Ag Bayer mitgeprägt und dazu beigetragen, dass es ein tolles Erlebnis war, hier zu Arbeiten.

Petra, für den Kaffee. Auch wenn es dir nicht so gut ging, du mal wieder eine Schraube locker hattest, oder dich an einem Pad verschluckt hast. Man musste dich meist nur kurz drücken, um dir einen leckeren schwarzen Kaffee mit samtiger Crema zu entlocken.

Meiner Inga, in den vergangenen Jahren hast du mich immer unterstützt, und hast mir Kraft gegeben, um mich zu wieder aufzurappeln und Freiraum, um abzuschalten. Mit dir an meiner Seite fühle ich mich wohl. Du bedeutest mir sehr viel und ich möchte ganz herzlich bei dir bedanken und wünsche mir für uns noch viele gemeinsame Jahre.

Meinen Eltern und meiner Schwester, meinen Omas und meinem Opa, Udo und Gabi, und den anderen Mitgliedern der Familie Stueckradt, die immer interessiert an meiner Arbeit und meiner Zukunft sind und waren. Ihr gebt mir als Familie Rückhalt, und ich weiß, dass immer jemand da ist, wenn ich ihn brauche.

Meinem Bruder Pascal, der auch die verzwicktesten Matlab-Probleme löst und alle Dissonanzen im Klangspektrum seiner Gitarre mit Fingergefühl und zur Not mit neuesten Filteralgorithmen bekämpft.

Meinen Freunden, die einem zu verstehen geben, wofür man lebt, und warum es sich lohnt, nie aufzugeben.

Lebenslauf

Christian Sinnen

Dipl.-Chem. (FH)

E-Mail: christian.sinnen@googlemail.com

Wissenschaftlicher und beruflicher Werdegang

- 03/2005 – ——— Doktorand und Wissenschaftlicher Mitarbeiter am
Zentrum für Medizinische Biotechnologie (ZMB)
der Universität Duisburg-Essen,
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Peter Bayer
Forschungsgebiet: Struktur und Dynamik von Proteinen
- 08/2004 – 11/2004 Diplomarbeit Beiersdorf AG, Hamburg
Physikalische Analytik (NMR)
Thema:
„NMR-Diffusionsmessungen an kosmetischen
w/o-Emulsionen“
- 10/2002 – 02/2003 Praktikum
Bayer AG, Bayer Technology Services, Wuppertal
Projekt zur Entwicklung und Optimierung von Bild- und
Fluoreszenzanalytischen Systemen
- 09/2000 – 12/2004 Chemie-Studium an der FH-Gelsenkirchen,
Abteilung Recklinghausen
Abschluss des Studiums als Diplom-Chemiker (FH)
- 08/1999 – 08/2000 1. Ausbildungsjahr zum Chemikanten bei der Veba Oel AG
- 09/1985 – 05/1998 Abitur, Gymnasium Petrinum Dorsten

Essen, 27. November 2008

Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Untersuchung von posttranslational modifizierten/modifizierenden Enzymen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Christian Sinnen befürworte.

Essen, den _____

Unterschrift eines Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____

Unterschrift des Doktoranden

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner andern Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

Unterschrift des Doktoranden